

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA



TESIS DOCTORAL

Identificación y caracterización molecular de mecanismos de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cristina Bernabé Balas

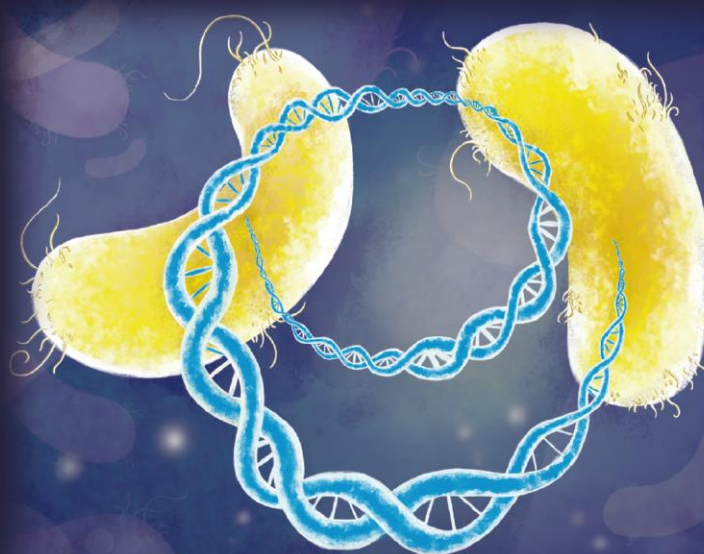
Director

Bruno González Zorn

Madrid



Identificación y caracterización molecular de mecanismos de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas



CRISTINA BERNABÉ BALAS

Bajo la dirección del Profesor Bruno González Zorn

Facultad de Veterinaria
Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular

Universidad Complutense de Madrid

Octubre 2019

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Veterinaria

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
MOLECULAR DE MECANISMOS DE ADAPTACIÓN
PLASMÍDICA A NUEVAS FAMILIAS BACTERIANAS**



Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

Cristina Bernabé Balas

Bajo la dirección del Profesor

Bruno González Zorn

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Cristina Bernabé Balas,
estudiante en el Programa de Doctorado Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina,
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

Identificación y caracterización molecular de mecanismos de adaptación plasmídica a nuevas
familias bacterianas

y dirigida por: Bruno González Zorn

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 3 de septiembre de 2019

Fdo.: CRISTINA BERNABÉ BALAS

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.

**A mis padres
y mi hermano**



AGRADECIMIENTOS

Cuando de pequeña soñaba con ser veterinaria y me dibujaba de mayor, en todos esos dibujos siempre aparecía rodeada de perritos y gatitos, en pijama y con un fonendo colgando del cuello, pero en ninguno de ellos aparecían bacterias. Sin embargo, tras algo más de seis años, no puedo estar más contenta por la decisión que tomé cuando terminé la carrera y decidí adentrarme en el (casi siempre) maravilloso mundo de la microbiología. Han sido seis años de mucho trabajo, de noches de agobio con los deadlines, de aparición de las primeras canas y arrugas, pero sobre todo, han sido seis años de grandes experiencias, de crecimiento profesional y personal, y de momentos inolvidables que siempre me traerán una sonrisa a la cara. Por todo ello, quiero dar las gracias a todas las personas que han estado a mi lado estos años. En especial, quiero dar las gracias:

A mis padres, por darme la libertad de elegir mi futuro y apoyarme siempre en todas mis decisiones, os quiero muchísimo. A mi hermano y al resto de mi familia, por ser un pilar fundamental de mi vida, muchas gracias.

A mis amigas segovianas, las de toda la vida, porque aunque nos vemos menos de lo que me gustaría, siempre estáis ahí cuando os necesito, ya sea para una llamada, un café rápido, una noche de confidencias o un viaje exprés. Sigue pendiente una excursión a Cuenca! :D. También a mis vets y a toda la gente maravillosa que he conocido en esta facultad durante los 11 años que llevo aquí, porque habéis permitido que forme parte de esta gran familia que es veterinaria. Especialmente al grupo de Mónica y al grupo de José, MBA, por la energía y buen rollo que habéis traído al departamento en estos últimos años; y a Miguel, por toda su ayuda durante el doctorado.

A Didier y todo su grupo del Pasteur, por acogerme durante tres meses, enseñarme y hacerme sentir una más, aunque sólo pudiera chapurrear algo de francés. En especial muchas gracias a Sebastián, Rocío y Jason, por hacer de mi estancia en París una experiencia única e inolvidable.

A todos los planes madrileños que han amenizado estos años de doctorado: cine, quiz, juegos de mesa, pádel, frontón, etc., y a toda la gente que me ha acompañado con ellos. Especialmente a Fer, porque de una forma u otra, llevas siendo un gran apoyo mucho tiempo, gracias!

Y finalmente, gracias a la familia ARU, porque sin vosotros, ahora mismo no podría estar escribiendo los agradecimientos de mi Tesis. Bruno, gracias por confiar en mi y darme la oportunidad de descubrir este pequeño universo de tu mano, has sido y seguirás siendo mucho más que mi Doktorvater. A todos y cada uno de los compañeros con los que he

coincido en el labo estos años, que ya sois unos cuantos, muchísimas gracias por vuestra ayuda. Gracias a Nata, por toda tu ayuda, tanto dentro como fuera del labo, y por acogirme en tu familia y recorrer el mundo juntas! A Alfonso, por enseñarme todo lo que sabías y por tus aportaciones desde el otro lado del charco; a Andreas, por tu paciencia infinita y tu buen rollo; a Gabi, por recordarnos continuamente que no hay que dejar las cosas para el último momento; a Bosco, por desarrollar mi capacidad de paciencia hasta extremos insospechados; a Emi, por volver a subir la media femenina en el labo y continuar con mi trabajo; a las nuevas incorporaciones, Carlos, Ana e Irene (gracias por tu diseño, no podría haber quedado más bonito), por ser un soplo de aire fresco; y, sobre todo, gracias a Dany, Cris, Jose (sin acento) y Manu, por ser mucho más que compañeros de trabajo, por todos y cada uno de los momentos que he vivido con vosotros, los viajes, las fiestas, las noches de juegos, las cenas del labo, los rechazos, los brownies, los parques de atracciones, los museos libaneses... básicamente, gracias por todo 😊.

A todos vosotros, ARU, gracias por hacer que cuando alguien me pregunta cómo ha sido esto de hacer la tesis, sólo sea capaz de responder que ha sido maravilloso.



TABLA DE CONTENIDOS

TABLA DE CONTENIDOS	1
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABLAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS	9
RESUMEN / SUMMARY	11
INTRODUCCIÓN	21
CAPÍTULO 1. DISEMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS	23
1.1. Antibióticos: un descubrimiento histórico	23
1.2. Resistencia a los antibióticos: situación actual y perspectivas	24
1.3. Transferencia horizontal de genes y su papel en la diseminación de la resistencia a antibióticos.....	28
1.4. Elementos genéticos móviles	31
1.4.1. Transposones.....	33
1.4.2. Integrones.....	35
1.4.3. Elementos integrativos y conjugativos (ICEs).....	37
1.4.4. Sistemas toxina-antitoxina (TA).....	39
CAPÍTULO 2. PLÁSMIDOS.....	42
2.1. Descripción de los plásmidos	42
2.2. Clasificación de los plásmidos.....	43
2.3. Éxito de los plásmidos en las poblaciones bacterianas	46
2.3.1. <i>Fitness cost</i> de los plásmidos y otros MGEs	46
2.3.2. Existencia y persistencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.....	51
2.3.2.1. Mecanismos de estabilización plasmídica	51
2.3.2.2. La evolución adaptativa como mecanismo de compensación del coste biológico.....	53
2.3.2.3. Interacciones epistáticas que reducen el coste biológico de los plásmidos	61
2.3.2.4. Interferencia clonal durante la evolución experimental	63
2.3.3. Evolución del rango de hospedador de los plásmidos	65
2.4. Los plásmidos tipo ColE1 para estudiar la adaptación plasmídica.....	68
2.4.1. Relevancia en la resistencia a antibióticos.....	72
2.4.2. Mecanismo de replicación de los plásmidos ColE1	73
2.4.3. Estabilidad de los plásmidos ColE1 en la población	77
2.4.4. El plásmido pB1000 como modelo de los ColE1 en <i>Pasteurellaceae</i>	80

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	83
MATERIALES Y MÉTODOS	87
1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	89
2. Antibióticos empleados y test de susceptibilidad.....	89
3. Plásmidos y construcciones plasmídicas realizadas.....	89
4. Oligonucleótidos, PCRs y secuenciación de ADN	90
5. Condiciones de transformación y electroporación de los plásmidos	91
6. Ensayos de evolución.....	94
7. Ensayos de estabilidad.....	95
8. Medición del coste biológico.....	96
9. Curvas de crecimiento.....	97
10. Determinación del número de copias plasmídicas (PCN)	98
11. Análisis estadístico de los datos.....	99
12. <i>Western Blots</i>	99
RESULTADOS	103
1. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DE pB1000 EN <i>E. COLI</i>	105
1.1. Estabilidad de pB1000 en su hospedador natural <i>H. influenzae</i> y en un nuevo hospedador, <i>E. coli</i>	105
1.2. Análisis de la estabilidad tras la coevolución de <i>E. coli</i> y pB1000.....	106
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EVOLUCIONADOS EN <i>E. COLI</i>	108
2.1. Secuenciación de los plásmidos evolucionados	108
2.1.1. Plásmidos obtenidos tras 500 generaciones de evolución.....	108
2.1.2. Dinámica de los cambios genéticos a lo largo de las evoluciones.....	110
2.2. Estabilidad de las variantes de pB1000	112
2.3. Caracterización del número de copias (PCN) y nivel de resistencia de las variantes de pB1000.....	114
2.4. Determinación del coste biológico de las variantes con secuencias de inserción	117
2.5. Estudio de la región donde se adquieren las ISS.....	118
2.5.1. Construcción de las variantes <i>mock</i>	119
2.5.2. Caracterización de las construcciones <i>mock</i> : estabilidad, PCN, CMI y <i>fitness cost</i>	119
2.6. Estudio del rango de hospedador de los plásmidos evolucionados	121
3. CARACTERIZACIÓN DEL ORF40 DE pB1000	124
3.1. Análisis <i>in silico</i> de la región donde se insertan las ISS	124

3.2.	Estudio del efecto del ORF40 con un vector de expresión	125
3.2.1.	Clonaje de los ORFs en el vector de expresión pBAD43	125
3.2.2.	Estabilidad de las construcciones plasmídicas en <i>E. coli</i>	126
3.2.3.	Análisis de la expresión del ORF40 mediante <i>Western Blot</i>	127
3.2.4.	Determinación del origen del ORF40	128
3.2.5.	Análisis <i>in silico</i> del ORF40	130
3.2.6.	Análisis fenotípico de las colonias	131
3.3.	Estudio del efecto genotípico del ORF40	133
3.3.1.	Obtención de mutantes cromosómicos	133
3.3.1.1.	Aproximación (i): construcción del mutante con triple ORF40	134
3.3.1.2.	Aproximación (ii): obtención de un mutante espontáneo de Ec-pBAD40	134
3.3.1.3.	Aproximación (iii): obtención de un mutante espontáneo de Ec-V4... ..	136
3.3.2.	Secuenciación del mutante fenotípico Ec-V4.2	139
3.3.3.	Efecto de la mutación de <i>dnaK</i> sobre la toxicidad generada por el ORF40	140
DISCUSIÓN		143
1.	LA ADAPTACIÓN DE pB1000 A UN NUEVO HOSPEDADOR ESTÁ MEDIADA POR SECUENCIAS DE INSERCIÓN Y SNPs EN EL <i>oriV</i>	145
1.1.	El modelo pB1000 en <i>E. coli</i>	145
1.2.	La coevolución plásmido-hospedador estabiliza pB1000 en <i>E. coli</i>	146
1.3.	La adquisición de ISs cromosómicas y los SNPs en el <i>oriV</i> estabilizan pB1000 en su nuevo hospedador	147
1.4.	La modulación del PCN y la reducción del <i>fitness cost</i> facilitan la adaptación plasmídica	152
1.5.	Las secuencias de inserción expanden el rango de hospedador de pB1000 ..	155
2.	LA EXPRESIÓN DEL ORF40 DE pB1000 Y SU TOXICIDAD SOBRE <i>E. COLI</i>	158
2.1.	La región interrumpida por las ISs es específica de plásmidos ColE1 de <i>Pasteurellaceae</i>	158
2.2.	La expresión del ORF40 induce un efecto tóxico en <i>E. coli</i>	159
2.3.	El ORF40 altera el fenotipo de <i>E. coli</i> y provoca la aparición de mutantes espontáneos capaces de compensar su toxicidad	162
2.4.	DnaK y su importancia en la compensación de la toxicidad del ORF40	164
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS		169
BIBLIOGRAFÍA		173

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de Paul Ehrlich y Alexander Fleming	24
Figura 2. Año de comercialización de antibióticos y detección de resistencia frente a los mismos	25
Figura 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos	27
Figura 4. Transferencia horizontal de elementos genéticos móviles entre bacterias.....	32
Figura 5. Estructura de los transposones	35
Figura 6. Mecanismo de integración de casetes de genes en un integrón	37
Figura 7. Movilización de los elementos integrativos y conjugativos.....	38
Figura 8. Funcionamiento de los sistemas toxina-antitoxina plasmídicos	40
Figura 9. Clasificación y distribución de los plásmidos	45
Figura 10. Causas del coste biológico asociado a los plásmidos	48
Figura 11. Mejora del <i>fitness</i> bacteriano tras la evolución compensatoria entre plásmido y hospedador	54
Figura 12. Tipos de cambios adaptativos en un experimento de evolución	55
Figura 13. Epistasis positiva entre dos plásmidos.....	62
Figura 14. Interferencia clonal durante la evolución adaptativa.....	64
Figura 15. Estructura de los plásmidos ColE1 de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	70
Figura 16. Estructura de los plásmidos ColE1 de la familia <i>Enterobacteriaceae</i>	71
Figura 17. Replicación de los plásmidos ColE1.....	74
Figura 18. Distribución de los plásmidos multicopia en una bacteria	78
Figura 19. Evolución experimental de pB1000 en <i>E. coli</i>	95
Figura 20. Estabilidad de pB1000 en <i>H. influenzae</i> y en <i>E. coli</i>	106
Figura 21. Estabilidad de pB1000 tras evolucionar 500 generaciones en <i>E. coli</i>	107
Figura 22. Estructura genética de pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10	109
Figura 23. (A) Cromatograma de pB1000 donde se aprecian dobles picos; (B) PCR de pB1000 donde se aprecian plásmidos con y sin ISs en la misma población	110
Figura 24. Dinámica de los cambios genotípicos de pB1000 a lo largo de los ensayos evolutivos en <i>E. coli</i>	111
Figura 25. Estabilidad de los plásmidos evolucionados en <i>E. coli</i> ancestral.....	114
Figura 26. Número de copias y nivel de resistencia de los plásmidos evolucionados.....	115
Figura 27. Correlación positiva entre número de copias y el nivel de resistencia.....	116
Figura 28. Coste biológico de pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10	118
Figura 29. Estructura genética de pB1000, pB1000::mock1 y pB1000::mock10.....	119
Figura 30. Estabilidad, número de copias, nivel de resistencia y coste biológico de pB1000::mock1 y pB1000::mock10.....	120
Figura 31. Estabilidad de pB1000.2310A.....	121
Figura 32. Análisis <i>in silico</i> de la región de pB1000 donde se insertan las ISs.	124
Figura 33. Clonaje del ORF3 y ORF40 en el vector pBAD43	126
Figura 34. Estabilidad de pBAD43, pBAD-3 y pBAD-40	127
Figura 35. <i>Western Blot</i> de la expresión del ORF40 en pBAD-40	128
Figura 36. Secuencia del ORF40 donde se aprecian los dos posibles codones de inicio...	129
Figura 37. Estabilidad de V1GTC y V4GTC.....	130

Figura 38. (A) Hidrofobicidad del ORF40 según la escala de Kyte-Doolittle. (B) Modelización de la estructura terciaria del ORF40.....	131
Figura 39. Fenotipo de las colonias de <i>E. coli</i> , Ec-pBAD, Ec-pBAD40, Ec-V1 y Ec-V4	132
Figura 40. Recuperación del fenotipo WT de las colonias de Ec-pBAD40.....	135
Figura 41. Estructura genética de pBAD-40 y pBAD-40::IS5.....	136
Figura 42. Fenotipo de las colonias de Ec-V4, de los mutantes Ec-V4.1, Ec-V4.2 y Ec-V4.3, y de los transformantes Ec-V4.1t, Ec-V4.2t y Ec-V4.3t	138
Figura 43. Deleción en el gen <i>dnaK</i> de Ec-V4.2	139
Figura 44. Estabilidad del plásmido V4GTC en Ec-V4.2 y Ec-V4.2t.....	140
Figura 45. Curvas de crecimiento de Ec-V4, Ec-V4.2 y Ec-V4.2t.....	142
Figura 46. Efecto de los péptidos hidrofóbicos a nivel de la membrana bacteriana.....	160

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Experimentos de evolución compensatoria que aumentan el <i>fitness</i> bacteriano..	56
Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo	92
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo	93
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	93
Tabla 5. Genotipo de los plásmidos evolucionados 500 generaciones.	108
Tabla 6. Plásmidos seleccionados para caracterizar su adaptación a <i>E. coli</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS UTILIZADAS

μl	Microlitro
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
BHR	Aplicado a los plásmidos, rango de hospedador amplio, de su término en inglés <i>Broad Host Range</i>
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DO	Densidad óptica, medida a 600 nanómetros
EE	Error estándar
<i>et al</i>	Locución latina, abreviada de <i>et alii</i> , que significa literalmente “y otros”
GTA	Agente de transferencia horizontal, de su término en inglés <i>Gene Transfer Agent</i>
HGT	Transferencia horizontal de genes o transferencia genética horizontal, de su término en inglés <i>Horizontal Gene Transfer</i>
ICE	Elemento integrativo y conjugativo, de su término en inglés <i>Integrative Conjugative Element</i>
<i>In silico</i>	Expresión utilizada para referirse a técnicas realizadas por ordenador o por simulación computacional
IS	Secuencia de inserción, de su término en inglés <i>Insertion Sequence</i>
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Mb	Megabase
	Sitio de clonaje múltiple, de su término en inglés <i>Multiple Cloning Site</i>
MGE	Elemento genético móvil, de su término en inglés <i>Mobile Genetic Element</i>
ml	Mililitro
NHR	Aplicado a los plásmidos, rango de hospedador reducido, de su término en inglés <i>Narrow Host Range</i>
nm	Nanómetro
nt	Nucleótido
O.N.	Crecimiento bacteriano hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, de su término en inglés <i>Overnight</i>
ORF	Marco de lectura abierta, de su término en inglés <i>Open Reading Frame</i> .
pb	Par de bases
PBRT	Tipado de replicón basado en PCR, de su término en inglés <i>PCR-Based Replicon Typing</i>
PCN	Número de copias plasmídicas, de su término en inglés <i>Plasmid Copy Number</i>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, de su término en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR cuantitativa

rpm	Revoluciones por minuto
RT	Tipado de replicón, de su término en inglés <i>Replicon Typing</i>
SNP	Polimorfismo de un único nucleótido, de su término en inglés <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TA	Toxina-antitoxina, referido a los sistemas toxina-antitoxina
UFC	Unidad formadora de colonia
V	Voltio
WB	<i>Western Blot</i> o técnica de electrotransferencia, utilizada para visualizar y cuantificar proteínas específicas
WGS	Secuenciación masiva del genoma, de su término en inglés <i>Whole-Genome Sequencing</i>
WT	Cepa silvestre, de su término en inglés <i>Wild Type</i>



RESUMEN / SUMMARY

RESUMEN

Identificación y caracterización molecular de mecanismos de adaptación plasmídica a nuevas familias bacterianas

Durante los últimos años la resistencia a antibióticos está aumentando de forma alarmante, aumento propiciado en gran medida por el mal uso que se ha hecho de estos fármacos desde su introducción en la práctica clínica. Esto ha facilitado la selección de bacterias multirresistentes y su diseminación en los ambientes microbianos.

Los plásmidos tienen un papel fundamental en la dispersión de resistencias, pues son capaces de transmitirse horizontalmente entre distintas poblaciones bacterianas, diseminando de esta forma los genes de resistencia a antimicrobianos. Cuando una bacteria adquiere un nuevo plásmido, no obstante, la replicación y expresión de los genes codificados en el plásmido puede suponer un elevado coste biológico para la bacteria, produciendo una ralentización de su crecimiento y menor competitividad frente a las bacterias libres del plásmido. En ambientes en los que no existe una presión selectiva, esto puede suponer la pérdida del plásmido en la población bacteriana. El coste biológico de los plásmidos puede ser compensado mediante evolución adaptativa, que permite la adaptación de los plásmidos a sus nuevos hospedadores y facilita su persistencia en la población. Sin embargo, la mayoría de los mecanismos de adaptación descritos son exclusivos de plásmidos conjugativos, y no pueden aplicarse a los plásmidos pequeños no conjugativos.

Los plásmidos ColE1 son plásmidos pequeños, movilizables y multicopia, que tienen un relevante papel en la diseminación de genes de resistencia, principalmente en la familia *Pasteurellaceae*. Los ColE1 están altamente adaptados a su hospedador, y nuestros trabajos previos revelan que son capaces de compensar su coste biológico mediante evolución compensatoria, pero se desconoce su capacidad de adaptación a otras familias bacterianas.

Por ello, los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fueron conocer la capacidad de adaptación de los plásmidos ColE1 a nuevos hospedadores, e identificar y caracterizar los mecanismos implicados en su adaptación.

Para llevar a cabo nuestra investigación empleamos como modelo el plásmido pB1000, el cual está altamente adaptado a la familia *Pasteurellaceae* y es estable en ausencia de presión antibiótica. Al ser adquirido por la enterobacteria *Escherichia coli*, pese a ser capaz de replicar, mostró una alta inestabilidad, reflejando su falta de adaptación a esta nueva especie. Para estudiar su capacidad de adaptación a *E. coli*, realizamos ensayos de evolución experimental durante 500 generaciones, en los que la coevolución de plásmido y hospedador permitió la estabilización de los plásmidos en la población.

Tras analizar los plásmidos evolucionados, comprobamos que su adaptación a *E. coli* se debió a la aparición de dos tipos de mutaciones: la adquisición de secuencias de inserción cromosómicas y la aparición de mutaciones puntuales (SNPs) en el origen de replicación plasmídico. Para investigar los mecanismos por los que estas mutaciones permitían la adaptación de pB1000, analizamos el número de copias, nivel de resistencia y coste biológico de los plásmidos evolucionados. Con esto, pudimos demostrar que la adaptación plasmídica a este nuevo hospedador se debió a dos mecanismos: los SNPs en el origen de replicación produjeron un aumento del número de copias plasmídicas, disminuyendo la probabilidad de aparición de segregantes libres de plásmido, mientras que las secuencias de inserción redujeron el coste biológico de pB1000 al interrumpir una secuencia específica del plásmido que generaba un elevado coste para la bacteria.

Posteriormente, investigamos el mecanismo por el que la interrupción de esta región aumentaba la estabilidad de pB1000. Para ello, realizamos un análisis *in silico* de dicha región, y determinamos la existencia de tres marcos de lectura abierta (ORFs) que quedaban interrumpidos por las secuencias de inserción, y que podrían estar expresando algún péptido de pequeño tamaño. Para averiguarlo, clonamos los dos principales candidatos,

ORF3 y ORF40, en el vector de expresión pBAD43 de manera independiente, y analizamos su estabilidad en condiciones de represión e inducción de los ORFs. Con esto, determinamos que el ORF40 era traducido en un péptido responsable de la inestabilidad del vector, y confirmamos la expresión de dicho péptido mediante *Western Blot*. Adicionalmente, realizando mutaciones en los dos posibles codones de inicio del ORF40, determinamos que su longitud total era de 42 aa.

Por otro lado, observamos que la expresión del ORF40 generaba una alteración del fenotipo de las colonias, dando lugar a colonias de un tamaño muy inferior al *wild type* y a una pequeña proporción de colonias mutantes que habían compensado el coste asociado al ORF40 y habían recuperado el fenotipo *wild type*. Al analizar estas colonias mutantes, comprobamos que la gran mayoría recuperaban el fenotipo al adquirir secuencias de inserción cromosómicas que interrumpían el ORF40. Sin embargo, uno de los mutantes obtenidos no presentó ninguna mutación en el plásmido, por lo que decidimos secuenciar su genoma para discernir si alguna mutación cromosómica era responsable de la recuperación del fenotipo *wild type*. Efectivamente, dicho mutante presentó una delección de 19 pares de bases en el gen *dnaK*, que acortaba la proteína DnaK en 80 aa. Esta proteína está relacionada con la generación de respuesta celular frente al estrés térmico y otros tipos de estrés ambiental, que pueden retrasar el crecimiento bacteriano hasta que dicho estrés es eliminado. De hecho, comprobamos mediante curvas de crecimiento que este mutante era capaz de crecer al mismo nivel al inducir y reprimir la expresión del ORF40, lo que confirmó la relación de la proteína DnaK con la respuesta celular inducida por el ORF40.

En conclusión, en este trabajo hemos comprobado que el plásmido pB1000 es capaz de adaptarse a nuevos hospedadores mediante la aparición de SNPs en su origen de replicación y la adquisición de secuencias de inserción cromosómicas, que producen un aumento del número de copias plasmídicas y una disminución de su coste biológico. Además, hemos descubierto que parte del coste biológico que produce pB1000 en su nuevo hospedador es

debida a la expresión de un pequeño péptido codificado en el plásmido, que genera una alteración del crecimiento bacteriano, y que puede estar relacionada con la respuesta al estrés generada por la proteína bacteriana DnaK.

SUMMARY

Identification and molecular characterization of plasmid adaptive mechanisms to novel bacterial families

During the recent years, the levels of antimicrobial resistance have been drastically increasing. This increase is exacerbated by the misuse of antibiotics since they were introduced into clinical practice, which has facilitated the selection of multiresistant bacteria and their dissemination in microbial environments.

Plasmids play a fundamental role in the dissemination of antibiotic resistance, as they can be transmitted horizontally among bacterial populations, leading to the spread of the resistance genes they harbor. However, when a bacterium acquires a new plasmid, the replication and translation of the genes encoded in the plasmid can produce a biological cost to the bacterium, which generates a growth deceleration and lower competitiveness against plasmid-free bacteria. In environments where there is no selective pressure, this could result in the loss of the plasmid in the bacterial population. The biological cost imposed by plasmids can be compensated by adaptive evolution, which allows the adaptation of plasmids to novel hosts and facilitates their persistence in the population. Nevertheless, most adaptive mechanisms described in literature are exclusively on conjugative plasmids and cannot be applied to small non-conjugative plasmids.

ColE1 plasmids are small, mobilizable, multicopy plasmids, that play a significant role in the dissemination of antibiotic resistance, especially in the *Pasteurellaceae* family. ColE1 plasmids are highly adapted to their host, and our previous work reveals that these plasmids are able to compensate their biological burden by adaptive evolution. However, their capacity to adapt to other bacterial families remains unknown. Hence, the main objectives of this Doctoral Thesis were to investigate the ability of ColE1 plasmids to adapt to novel hosts, and to identify and characterize the mechanisms involved in their adaptation.

We used the plasmid pB1000 as a model. This plasmid is highly adapted to the *Pasteurellaceae* family and it is stable in the absence of antibiotic pressure. When pB1000 is acquired by the enterobacteria *Escherichia coli*, despite being able to replicate in it, it was very unstable, showing its lack of adaptation to this new bacterial species. To study the capacity of pB1000 to adapt to *E. coli*, we performed experimental evolution assays over 500 generations. During this period, the coevolution of plasmid and host drove the stabilization of the plasmids in the population.

The analysis of the evolved plasmids revealed that their adaptation to *E. coli* was due to two types of mutations: the acquisition of chromosomal insertion sequences (ISs) and the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the origin of replication of the plasmid. To investigate the mechanisms by which these mutations allowed the adaptation of pB1000, we analyzed the plasmid copy number, the resistance level and the biological cost of the evolved plasmids in the ancestral host. The results indicated that the adaptation of pB1000 to the new host occurred by two mechanisms: the SNPs in the origin of replication increased the plasmid copy number, which reduced the probability of plasmid-free segregates, while the insertion sequences reduced the biological cost of pB1000 by the disruption of a specific sequence of the plasmid that was highly costly for the bacterium.

Subsequently, we explored the mechanism by which the disruption of that region increased the stability of pB1000. To do so, we analyzed that sequence of pB1000 *in silico*, and we found 3 open reading frames (ORFs) that were disrupted by the ISs, from which a small peptide could be expressed. To investigate this possibility, we separately cloned the two best candidates, ORF3 and ORF40, in the expression vector pBAD43, and analyzed the stability of the constructions under repressing and inducing conditions. By doing this, we determined that ORF40 was translated into a peptide that was responsible for the instability of the vector, and we confirmed the expression of the peptide by Western Blot. Additionally,

by mutating the two possible start codons of ORF40, we determined that the total length of the peptide was 42 aa.

Moreover, we observed that the expression of ORF40 produced an altered phenotype of the colonies, generating colonies that were smaller from the wild type phenotype, and a small proportion of mutant phenotypes that were able to compensate the cost associated to the expression of ORF40 and recovered the wild type phenotype. The analysis of these mutant colonies revealed that, in most of them, the ORF40 was disrupted by a chromosomal insertion sequence. However, one of the mutants did not have any mutations in the ORF40 or the plasmid, suggesting that a mutation in the chromosome could be involved in the recovery of the phenotype. Indeed, by sequencing this mutant, we found a 19-base pair deletion in the *dnaK* gene, that eliminated the last 80 aa of the protein DnaK. This protein is associated with the generation of the heat shock response and other types of environmental stress, that can inhibit the bacterial growth until the stress is eliminated. By performing growth curves, we determined that this mutant had the same growth pattern both inducing and repressing the expression of ORF, which confirmed the relationship between the protein DnaK and the cellular response induced by the expression of ORF40.

In conclusion, in this work we proved that the plasmid pB1000 can adapt to novel hosts by the acquisition of SNPs in the origin of replication and by the acquisition of chromosomal insertion sequences, which produce an augmentation of the plasmid copy number and a reduction of the biological cost. Additionally, we determined that part of the biological cost imposed by pB1000 to its novel host is induced by the expression of a small peptide encoded in the plasmid. This peptide produced an altered bacterial growth, that could be related with the stress response generated by the bacterial protein DnaK.



INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. DISEMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

1.1. Antibióticos: un descubrimiento histórico

Las bacterias, arqueas y otros microorganismos dominaron la vida en la Tierra hasta hace 650 millones de años (Brocks *et al.*, 2017), por lo que los seres humanos hemos convivido con ellos desde el principio de nuestro tiempo. De la misma forma, nuestras civilizaciones han estado expuestas a sustancias antibióticas producidas por bacterias y otros microorganismos durante miles de años. Por ejemplo, en civilizaciones como el Antiguo Egipto, China, y Roma se sabe que aplicaban pan con moho de forma tópica para tratar heridas, y se han encontrado trazas de tetraciclina – antibiótico ampliamente empleado en la actualidad – en esqueletos humanos que datan de los siglos IV-V d.C., que sugieren la ingesta regular de alimentos contaminados con *Streptomyces* (Cook *et al.*, 1989; Gould, 2016).

A su vez, la población humana ha estado expuesta a multitud de enfermedades infecciosas que, antes del descubrimiento de los antibióticos, eran intratables y presentaban unas elevadas tasas de mortalidad (Mohr, 2016). Por ello, a comienzos del siglo XX numerosos científicos se interesaron en descubrir compuestos y fármacos eficaces frente a aquellas enfermedades que diezmaban la población, tales como la sífilis, cólera o tuberculosis, entre otras. Si bien Paul Ehrlich fue el primero en descubrir y comercializar un tratamiento antimicrobiano efectivo frente a *Treponema pallidum* – agente causal de la sífilis – en 1910 (Witkop, 1999), el descubrimiento del primer antibiótico, la penicilina, se atribuye a Alexander Fleming (Fleming, 1929; Figura 1). Su descubrimiento en 1928 y su comercialización en 1945 les valieron tanto a él como a Howard Florey y Ernst Chain el Premio Nobel de Medicina en 1945.

A partir de ese momento comenzó la que se conoce como “Edad Dorada” de los antibióticos, en la que numerosos antibióticos tanto de origen natural como semisintéticos y sintéticos

salieron al mercado (Ribeiro da Cunha *et al.*, 2019). Este hito histórico supuso no solo la cura de enfermedades bacterianas hasta la fecha mortales, sino que abrió nuevos campos en la medicina y la cirugía, y permitió el desarrollo de técnicas que ahora consideramos casi rutinarias – cirugías cardíacas, trasplantes, implantes protésicos, entre muchas otras (Ventola, 2015a).

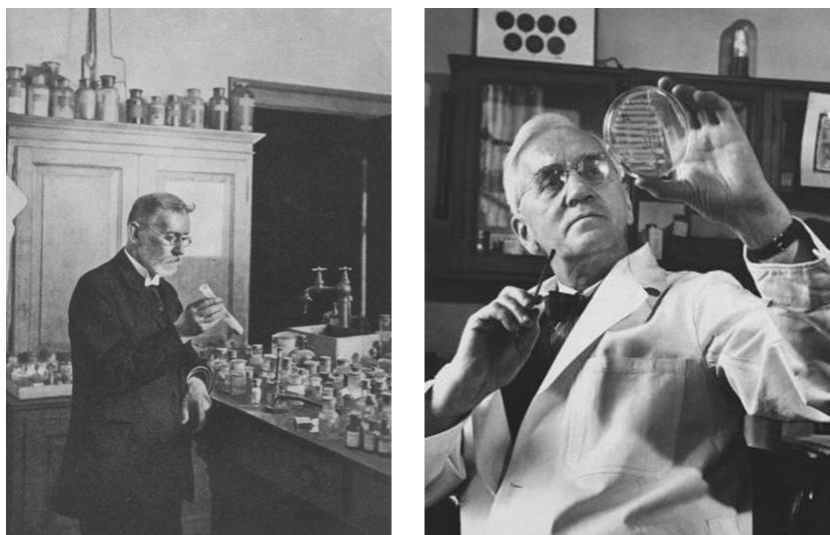


Figura 1. Paul Ehrlich (izquierda) y Alexander Fleming (derecha), considerados padres de la antibioterapia.

1.2. Resistencia a los antibióticos: situación actual y perspectivas

Las bacterias, al igual que nosotros, también llevan miles de años expuestas a la acción de moléculas antibióticas, y han sido capaces de generar mecanismos de resistencia a los antibióticos producidos tanto por otros microorganismos como por ellas mismas (Davies & Davies, 2010; Figura 2). La primera vez que se detectaron bacterias resistentes a penicilina fue en 1940, pocos años después de su descubrimiento (Abraham & Chain, 1988). En el caso de la meticilina se encontraron bacterias resistentes en 1962, tan solo dos años después de su comercialización (Ventola, 2015a). Este patrón es constante para todos los antibióticos que se han ido comercializando, ya que pocos años después o incluso en el mismo año se detectan bacterias capaces de resistir a los mismos. El grave problema de resistencia al que nos enfrentamos queda reflejado en el caso de la plazomicina. La plazomicina es el último

antibiótico que ha salido al mercado, habiéndose aprobado en el 2018 para el tratamiento de infecciones complicadas del tracto urinario en adultos (EMA, 2018). Sin embargo, se ha visto que las metiltransferasas adquiridas del ARNr 16S, descritas en enterobacterias hace más de quince años (Galimand *et al.*, 2003; Gonzalez-Zorn *et al.*, 2005), anulan por completo su eficacia (Shaeer *et al.*, 2019).

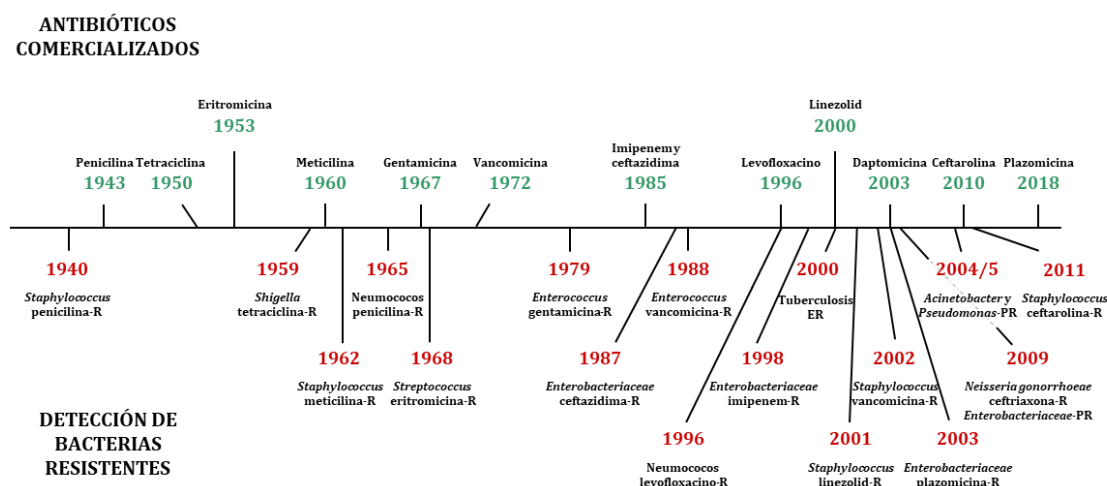


Figura 2. Línea temporal que muestra el corto periodo entre la comercialización de antibióticos (parte superior) y la detección de resistencias frente a los mismos (parte inferior). R: resistente. ER: extremadamente resistente. PR: pan-resistente. Modificado de (CDC, 2013).

La resistencia a los antibióticos es un fenómeno natural (Prestinaci *et al.*, 2015). Sin embargo, en la actualidad nos enfrentamos a una crisis sin precedentes en la que cada vez aparecen más bacterias multirresistentes e incluso pan-resistentes, frente a las que no existe ningún tratamiento posible, y esto está haciendo que enfermedades hasta ahora fácilmente tratables vuelvan a incrementar sus tasas de mortalidad (Aslam *et al.*, 2018). Esta grave situación ha sido provocada principalmente por el uso masivo e indiscriminado que se ha hecho de los antibióticos, tanto a nivel terapéutico y profiláctico como a otros niveles. De hecho, a día de hoy todavía existen países en los que se siguen administrando antibióticos como promotores del crecimiento, pese a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud de prohibir su uso en animales sanos (WHO, 2017). A esto se suma la escasez de nuevos antibióticos en las últimas décadas, debida en gran medida a la ausencia

de incentivos económicos a las industrias farmacéuticas y a los exigentes requisitos de comercialización (Ventola, 2015a).

Por todo ello, desde hace unos años las principales organizaciones internacionales relacionadas con la salud están elaborando planes y campañas con el fin de concienciar a los facultativos sanitarios y a la población en general de la gravedad de la resistencia a antibióticos y de la importancia de tomar medidas para frenar su avance (Shallcross & Davies, 2014; Ventola, 2015b). La Organización Mundial de la Salud está promoviendo la elaboración de planes nacionales de resistencia a antibióticos y la mejora de los sistemas de prevención y control sanitario. Así mismo, está coordinando numerosas iniciativas para concienciar sobre el problema de la resistencia a antibióticos y para apoyar la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos. Entre estas iniciativas destacan la Semana Mundial de Concienciación sobre el uso de los Antibióticos (<http://www.who.int/campaigns/world-antibiotic-awareness-week>) (WHO, 2019) o el Sistema de Vigilancia de la Resistencia a Antibióticos Global (GLASS: *Global Antimicrobial Resistance Surveillance System*) (<http://www.who.int/glass>) (GLASS, 2019).

Existen bacterias intrínsecamente resistentes a algunos antibióticos, simplemente por carecer de la diana específica del antibiótico, o por la presencia de genes que inactiven el antibiótico o que lo expulsen al exterior (Blair *et al.*, 2015). No obstante, todas las bacterias son capaces de adquirir resistencia a los antibióticos mediante cambios en su genoma a distintos niveles. Existen multitud de mecanismos de resistencia diferentes, que quedan resumidos en la Figura 3. Aunque no es el principal objetivo de esta Tesis doctoral, comentaré brevemente los distintos mecanismos de resistencia a antibióticos que existen para dar una idea global de la amplia variedad de estrategias biológicas que pueden dar lugar a resistencia.

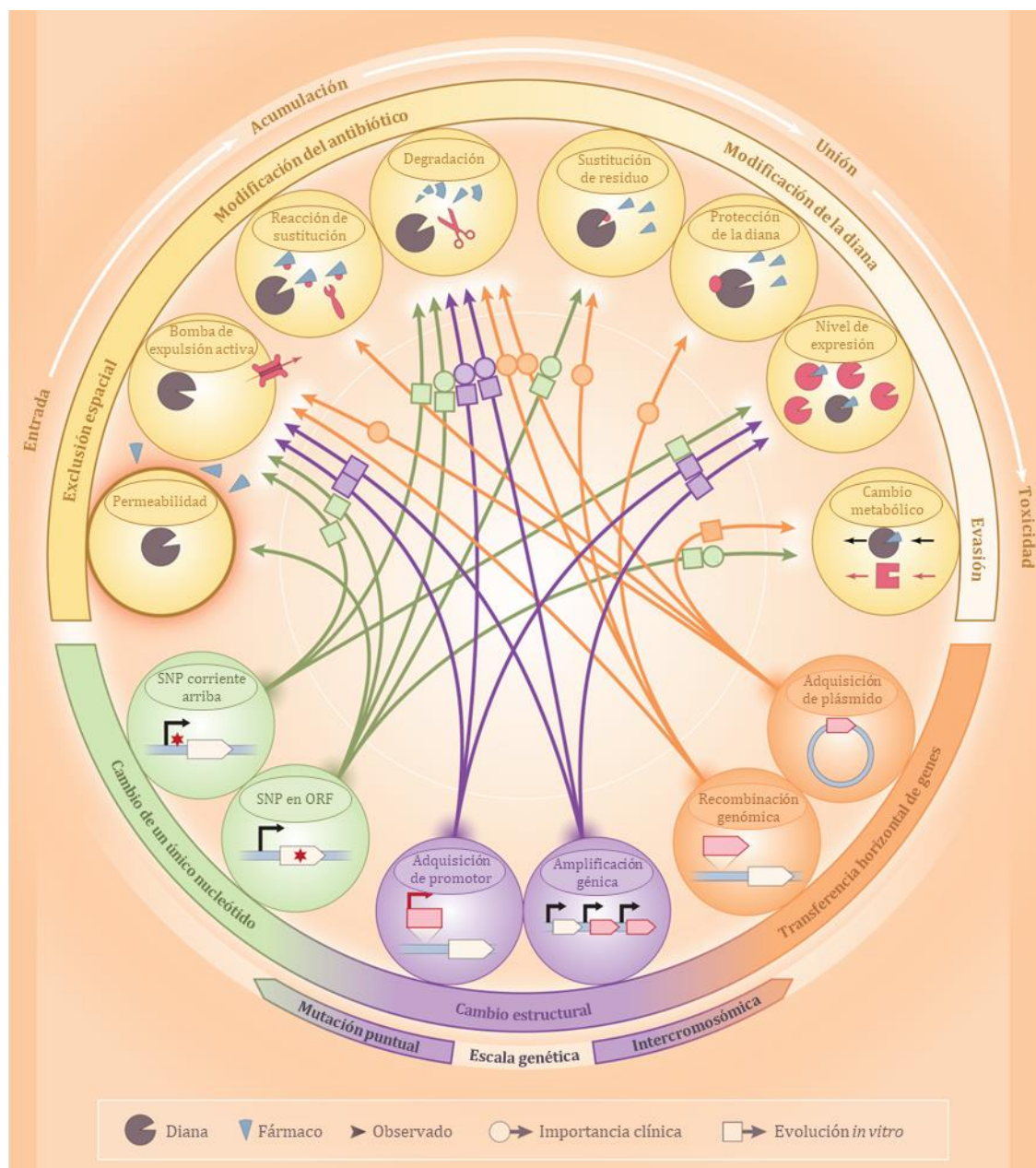


Figura 3. Mecanismos de resistencia a antibióticos. En la parte superior se muestran los distintos niveles a los que puede actuar el mecanismo de resistencia. En la parte inferior se muestran las posibles bases genotípicas del mecanismo de resistencia. Modificado de (Yelin & Kishony, 2018).

En cuanto al nivel de acción sobre el antibiótico, los mecanismos de resistencia pueden actuar sobre (i) la concentración intracelular del antibiótico – por ejemplo disminuyendo la permeabilidad de la membrana, aumentando la expresión de bombas de expulsión activa o modificando la estructura química del fármaco –, (ii) la unión del antibiótico a su diana celular – por ejemplo modificando la diana, protegiéndola o alterando sus niveles de expresión – o (iii) la toxicidad del antibiótico – por ejemplo realizando rutas metabólicas

alternativas para evadir el efecto del fármaco en el caso en que éste actúe sobre una etapa esencial del metabolismo celular (Yelin & Kishony, 2018).

Por otro lado, la resistencia a antibióticos puede estar codificada en distintas escalas a nivel genético (Munita & Arias, 2016). Las bacterias pueden adquirir resistencia mediante (i) la mutación de un único nucleótido – a nivel del promotor o del marco de lectura abierta u ORF –, (ii) cambios estructurales en su genoma – por ejemplo, por el movimiento o inserción de promotores o por la duplicación de genes – o (iii) la adquisición de nuevo material genético gracias a la transferencia horizontal de genes o HGT, que puede tanto integrarse en el cromosoma bacteriano como mantenerse en la célula en forma de material extracromosómico.

1.3. Transferencia horizontal de genes y su papel en la diseminación de la resistencia a antibióticos

La transferencia horizontal de genes o HGT es un mecanismo que permite el movimiento de material genético de forma horizontal o lateral, opuesto a la transmisión vertical de los genes a la descendencia (Keeling & Palmer, 2008; Soucy *et al.*, 2015), y que fue descrito por primera vez a finales de los años 40 en *Escherichia coli* (Tatum & Lederberg, 1947).

Gracias a la cantidad de información genómica que existe en la actualidad se han identificado fenómenos de HGT no solo en procariotas, sino también en organismos eucariotas complejos (Soucy *et al.*, 2015). Por ejemplo, está ampliamente aceptado que las mitocondrias y los plastos evolucionaron a partir de bacterias endosimbióticas que fueron fagocitadas (Sagan, 1967), pero existen muchos más casos de intercambio genético entre bacterias y eucariotas, bacterias y arqueas, etc. (de la Cruz & Davies, 2000; Soucy *et al.*, 2015).

No obstante, la HGT tiene un papel fundamental en la evolución, adaptación y diversidad de los genomas bacterianos, ya que les permite obtener de manera rápida y eficaz genes que proporcionen a la bacteria una ventaja adaptativa sobre el resto de la población (Ochman *et al.*, 2000; Soucy *et al.*, 2015). De hecho, la transferencia horizontal es la principal estrategia genética bacteriana para la adquisición de nuevos genes, favoreciendo la diseminación de los mismos entre bacterias tanto próximas como muy distantes filogenéticamente (Oliveira *et al.*, 2017).

Existen tres mecanismos “clásicos” de transferencia horizontal de genes en procariotas (Thomas & Nielsen, 2005):

- Transformación: adquisición, integración y expresión de ADN libre extracelular. Para que tenga lugar, las bacterias deben encontrarse en un estado de competencia, que puede alcanzarse de manera natural – en respuesta a determinados estímulos ambientales como acceso a nutrientes, densidad celular, etc. – o de manera artificial – mediante protocolos de laboratorio que permiten llevar a las células a un estado de electrocompetencia o quimiocompetencia, facilitando la entrada de ADN exógeno a través de su membrana.
- Transducción: transferencia de material genético de una bacteria a otra vehiculado por un bacteriófago. A su vez la transducción puede ser generalizada – cuando durante la lisis bacteriana un fago adquiere un fragmento de ADN bacteriano puro y lo transfiere al infectar otra célula bacteriana – o especializada – cuando un profago, cuyo genoma se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano, se escinde de forma incorrecta y vehicula una pequeña parte del ADN bacteriano al infectar otra bacteria.
- Conjugación: transferencia de ADN entre dos células bacterianas conectadas a través de un *pilus* conjugativo a través del cual el ADN pasa de la bacteria donadora

a la bacteria receptora. Este sistema de transferencia genética horizontal se caracteriza por la unión de las dos bacterias gracias a la expresión del sistema de secreción tipo IV (T4SS), que permite la formación del *pilus*. Es un mecanismo muy utilizado por los plásmidos conjugativos, que cuentan en su secuencia con todos los genes necesarios para la conjugación; sin embargo, también se trata de un proceso con un alto coste metabólico para la célula, pues requiere la expresión e interacción de numerosas proteínas (Ilangovan *et al.*, 2015).

Aparte de los tres mecanismos descritos, existen otras formas de HGT, descubiertas posteriormente, como son los agentes de transferencia de genes (GTAs) (Solioz *et al.*, 1975). Los GTAs son elementos similares a los bacteriófagos, probablemente evolucionados a partir de profagos, pero, a diferencia de éstos, suelen movilizar exclusivamente ADN genómico bacteriano – en contraposición a los fagos, que movilizan e insertan el genoma fágico completo en el cromosoma bacteriano – gracias a estímulos controlados por el hospedador (Lang *et al.*, 2012). Los GTAs han sido descritos tan solo en algunas bacterias (los más estudiados son el GTA de *Rhodobacter capsulatus* y el del género *Bartonella*) y arqueas (Bertani, 1999; Lang & Beatty, 2000; Tamarit *et al.*, 2018). Más recientemente, se ha descrito un nuevo mecanismo de transducción, denominado transducción lateral, en *Staphylococcus aureus*, que permite la movilización de grandes fragmentos de ADN genómico a través de profagos integrados en su cromosoma (Chen *et al.*, 2018b). Por otro lado, existen algunos casos de fusión celular en bacterias, como los descritos en *Haloferax* spp. y en *Sulfolobus* spp. (Soucy *et al.*, 2015), aunque se trata de un mecanismo menos frecuente. Por último, también se han descrito vesículas de membrana, nanotubos y la autólisis como mecanismos bacterianos de transferencia genética horizontal (García-Aljaro *et al.*, 2017).

Mediante cualquiera de estos mecanismos, las bacterias pueden transferir genes de resistencia a antibióticos a otras bacterias que se encuentren habitando su mismo ecosistema. De esta forma, en un ambiente con presión selectiva (en este caso un antibiótico) en el que solo sobreviven bacterias resistentes a dicho fármaco, la HGT provocará que bacterias inicialmente sensibles puedan adquirir genes de resistencia que aseguren su supervivencia. De hecho, se ha comprobado que la HGT puede proporcionar ventajas adaptativas más rápidamente que la aparición de mutaciones cromosómicas espontáneas (Rodríguez-Beltran *et al.*, 2018; Lerminiaux & Cameron, 2019).

En la mayoría de los casos, los genes de resistencia movilizados mediante HGT suelen ir asociados a elementos genéticos móviles (MGEs), por lo que en el siguiente apartado describiré brevemente cada uno de estos sistemas y destacaré su papel en la diseminación de los genes de resistencia a antibióticos.

1.4. Elementos genéticos móviles

Los elementos genéticos móviles (MGEs) son segmentos de ADN que codifican enzimas y otras proteínas y que permiten el movimiento del ADN dentro del genoma – movilidad intracelular – y entre células bacterianas – movilidad intercelular (Frost *et al.*, 2005). Aparte de codificar los genes necesarios para su propia replicación, los MGEs en muchas ocasiones movilizan y transfieren genes bacterianos que pueden aportar ventajas adaptativas a la nueva célula hospedadora y por tanto a la población (Rankin *et al.*, 2011). Gracias a su capacidad para movilizar genes dentro y entre distintas bacterias, los MGEs tienen un papel fundamental en la diversidad y la evolución de los genomas bacterianos, y se les ha calificado como agentes de una “fuente continua de evolución” debido que permiten a las poblaciones bacterianas el acceso a numerosos genes que las dotan de características beneficiosas en determinados ambientes (Frost *et al.*, 2005; Rankin *et al.*, 2011).

La Figura 4 representa los principales MGEs que pueden transferirse de forma tanto intra como intercelular gracias a los mecanismos de HGT descritos previamente.

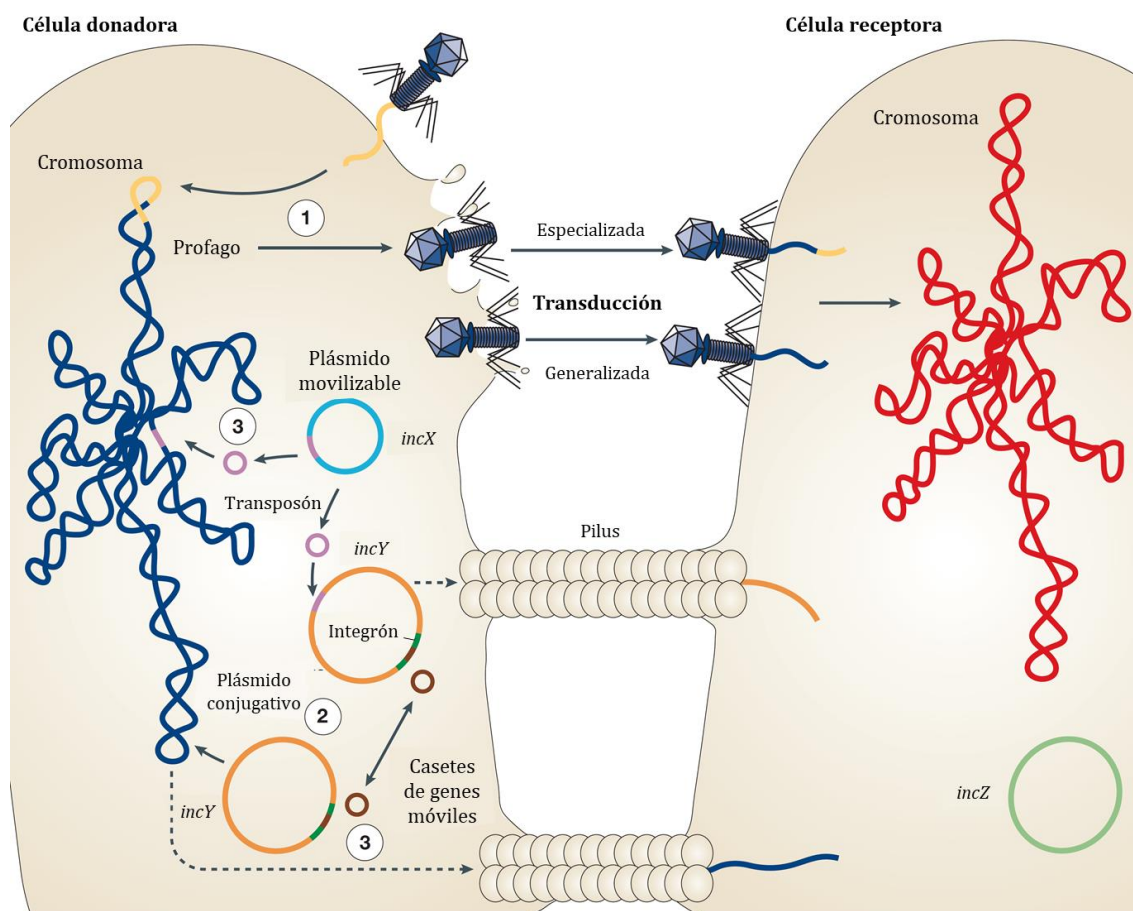


Figura 4. Transferencia de ADN entre bacterias. Transducción (1): el ADN de un bacteriófago (amarillo) se inserta en el cromosoma (azul oscuro) en forma de profago; tras la replicación, puede empaquetar ADN fágico junto con ADN bacteriano (transducción especializada) o solamente ADN bacteriano (transducción generalizada), lisar la bacteria e infectar una nueva célula. Conjugación (2): los plásmidos grandes conjugativos (naranja) y los Elementos Integrativos Conjugativos (ICEs; no mostrados) emplean los *pilus* para transferirse a otras células mediante la conjugación. Alternativamente, un plásmido pequeño o isla genómica defectuosa o una copia del cromosoma bacteriano completo pueden transferirse a una nueva célula, donde estos elementos genéticos pueden insertarse en el cromosoma o replicar de manera independiente si son compatibles con los plásmidos presentes (verde claro). Transposición (3): los transposones (rosa) se integran en el cromosoma o en plásmidos mediante recombinación no homóloga. Los integrones (verde oscuro) emplean mecanismos similares para intercambiar casetes de un único gen (marrón). Modificado de (Frost *et al.*, 2005).

En muchos casos los MGEs llevan asociados distintos tipos de determinantes genéticos, como genes de resistencia a antibióticos, genes de virulencia y genes que proveen características metabólicas innovadoras para la bacteria o rutas metabólicas alternativas (Ochman *et al.*, 2000; Rankin *et al.*, 2011). Es por ello que los MGEs tienen un papel esencial en la adquisición y propagación de genes de resistencia a antibióticos, y han contribuido en

gran medida a la aparición de bacterias multirresistentes y a la crisis de resistencia a antibióticos contra la que nos enfrentamos en la actualidad (Stokes & Gillings, 2011; Sultan *et al.*, 2018).

Dentro de los diferentes elementos genéticos móviles, hay tres que destacan por su papel fundamental en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos: transposones, integrones y plásmidos. Además de esos, también son relevantes los elementos integrativos conjugativos (ICEs) y los sistemas toxina-antitoxina (TAs). Estos últimos, pese a no ser elementos móviles como tal, ya que no son capaces de movilizarse de manera autónoma, están frecuentemente asociados a plásmidos y otros MGEs y son relevantes para su mantenimiento en las poblaciones. Este trabajo se centrará en los plásmidos, por lo que en este apartado describiré brevemente el resto de sistemas, y profundizaré en la descripción de los plásmidos en el siguiente capítulo.

1.4.1. Transposones

Los transposones o elementos transponibles (ETs) son secuencias de ADN capaces de moverse e insertarse en distintas posiciones dentro de la misma o de otra molécula de ADN gracias a una enzima transposasa que codifican en su secuencia (Babakhani & Oloomi, 2018). Esta transposición puede ser replicativa – cuando el elemento transponible es duplicado, formando un cointegrado del ADN donador y el ADN receptor del transposón, que finalmente se resuelve, quedando una copia del transposón en cada molécula de ADN (conocido como mecanismo de copiar-y-pegar) – o conservativa – cuando el transposón se moviliza de un lugar a otro sin generar una nueva copia (conocido como mecanismo de cortar-y-pegar; Derbyshire & Grindley, 1986).

En general, los transposones pueden clasificarse en tres grupos atendiendo a su estructura, los cuales quedan esquematizados en la Figura 5:

- **Secuencias de inserción o transposones simples (ISs):** están compuestas por un gen (dos en algunos casos) codificante de una transposasa (*tnp*), flanqueado por dos regiones terminales denominadas repeticiones invertidas (IRs), derecha e izquierda (IR_L e IR_R) de 10-40 pares de bases cada una (Sultan *et al.*, 2018). Están presentes en un número variable de copias en los cromosomas bacterianos, y hasta la fecha se han descrito más de 4.500 agrupadas en 29 familias (Vandecraen *et al.*, 2017). Si bien no transfieren genes de resistencia a antibióticos, pueden afectar a la expresión de genes cromosómicos insertándose e interrumpiendo su secuencia o su promotor, o pueden incrementar la expresión de genes de resistencia creando promotores híbridos o aportando su propio promotor al insertarse corriente arriba de los genes de resistencia (Nzabarushimana & Tang, 2018). Es el caso de *ISAbal*, que se inserta corriente arriba de genes *bla*_{OXA-51}-like en *Acinetobacter baumannii*, confiriendo resistencia a carbapenemas (Turton *et al.*, 2006).

- **Transposones compuestos (Tn):** están formados por una región de ADN central flanqueada a ambos lados por secuencias de inserción, generalmente la misma IS a ambos lados o similares – por ejemplo, el transposón Tn10 porta dos copias de la IS10, llamadas IS10_R e IS10_L, pero existen ligeras diferencias entre ambas que hacen que sólo la IS10_R sea funcional para su transposición (Kleckner, 1990) –, que pueden encontrarse en la misma orientación o en orientación invertida. Su papel en la diseminación de la resistencia a antibióticos es crucial, ya que en su región central pueden codificar uno o varios genes de resistencia a antibióticos y, al poder movilizarse como una unidad, son capaces de diseminar dichos genes desde el cromosoma a otras bacterias (Sultan *et al.*, 2018). Algunos ejemplos de transposones asociados a genes de resistencia son Tn10, asociado con resistencia a tetraciclina (Hillen & Berens, 1994); Tn5, asociado con resistencia a kanamicina, estreptomicina y bleomicina (Putnoky *et al.*, 1983; Genilloud *et al.*, 1984); o Tn6330.2, recientemente asociado con resistencia a colistina – aunque la

diseminación del gen de resistencia a colistina *mcr-1* se ha asociado generalmente a la secuencia de inserción *IS_{Apl1}* únicamente, se ha demostrado que el transposón Tn6330.2, flanqueado por *IS_{Apl1}* a ambos lados, también es capaz de movilizar *mcr-1* (Poirel *et al.*, 2017).

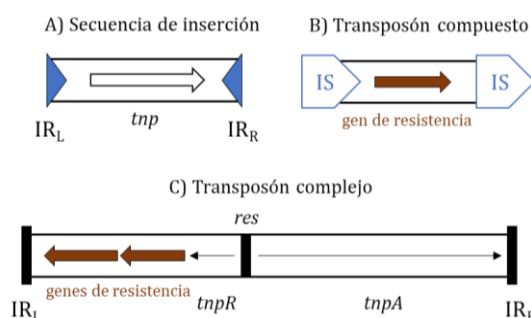


Figura 5. Representación esquemática de los tres grupos de transposones en base a su estructura. Modificado de (Partridge *et al.*, 2018).

- **Transposones no compuestos o transposones complejos:** este tipo de transposones se diferencian de los anteriores en que no contienen una *IS* completa en ambos extremos, sino que solamente contienen las regiones invertidas IR_L e IR_R . En su región central codifican una transposasa (*tnpA*), una resolvasa (*tnpR*) y un sitio de resolución (*res*) (Partridge *et al.*, 2018). Aparte de estos tres elementos, pueden portar otro tipo de genes, como genes de resistencia a antibióticos. Los más conocidos son los pertenecientes a la familia Tn3, que incluye transposones con genes de resistencia frente a ampicilina, estreptomicina o vancomicina, además de genes con otras funciones como resistencia a metales pesados o funciones catabólicas (Nicolas *et al.*, 2015; Partridge *et al.*, 2018).

1.4.2. Integrones

Los integrones o elementos de integración son secuencias genéticas potencialmente móviles, capaces de integrarse tanto en cromosomas como en plásmidos y expresar genes

que aportan distintas funciones a su hospedador (Hall & Collis, 1995). Su estructura está caracterizada por tres componentes fundamentales:

- Un gen *intI*, que codifica una tirosin recombinasa específica de sitio
- Un sitio de recombinación *attI*, generalmente localizado corriente arriba del gen *intI*
- Un promotor (Pc), situado dentro del gen *intI* o entre dicho gen y el sitio *attI*

Además, los integrones suelen incorporar uno o varios casetes de genes, los cuales están formados cada uno de ellos por un (ocasionalmente dos) gen que carece de promotor, e incluyen un sitio *attC*. La función de la enzima recombinasa consiste en catalizar la recombinación entre el sitio *attI* del integrón y el sitio *attC* del casete, lo cual permite la integración del casete dentro del integrón, de tal manera que sus genes son expresados a partir del promotor que se encuentra en la estructura del integrón (Hall & Collis, 1995; Partridge *et al.*, 2018; Figura 6). Esta inserción de casetes puede darse múltiples veces dentro de un mismo integrón, dando lugar a integrones capaces de movilizar numerosos genes que aporten ventajas adaptativas a la bacteria. La expresión de dichos genes se realiza a partir del promotor Pc que se encuentra en el extremo del integrón, lo cual hace que los primeros casetes de genes tengan una mayor expresión, mientras que dicha expresión va disminuyendo a medida que se alejan del promotor. Esto hace que los integrones puedan acumular numerosos genes a un coste muy bajo, y puedan reajustarlos posteriormente en función del ambiente al que se expone la bacteria. De hecho, se ha visto que la movilización y reajuste de los diferentes casetes es estimulada por la respuesta SOS bacteriana, la cual es inducida por diferentes tipos de estrés celular, como la exposición a determinados antibióticos, y esto puede permitir la expresión de genes de resistencia que hasta ese momento estaban silenciados (Guerin *et al.*, 2009). Debido a la capacidad de los integrones para acumular numerosos genes de resistencia a antibióticos y a expresarlos de manera

selectiva, los integrones están considerados como uno de los principales responsables de la aparición de cepas clínicas multirresistentes, principalmente en bacterias Gram negativas (Escudero *et al.*, 2015).

En función del tipo de integrasa que portan, los integrones pueden clasificarse en 4 clases principales, siendo la primera de ellas la más relacionada con la adquisición y movilización de genes de resistencia a antibióticos (Partridge *et al.*, 2018; Sultan *et al.*, 2018).

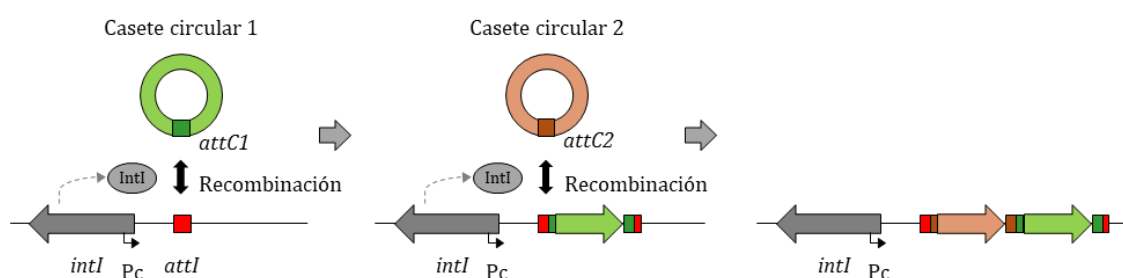


Figura 6. Estructura y mecanismo de integración de los casetes de genes en un integrón. A la izquierda está representada la estructura típica de un integrón: el gen *intI* con el promotor *Pc*, y el sitio *attI*. Ante la llegada de un casete circular, se expresa la integrasa *IntI*, que produce la recombinación entre el sitio *attI* y el sitio *attC1* del casete, y el casete de genes queda integrado (figura central). Si llega un segundo casete de genes, el proceso se repite, quedando este nuevo casete integrado en primera posición (figura de la derecha), y así sucesivamente, pudiendo dar lugar a la integración de múltiples casetes de genes. Modificado de (Escudero *et al.*, 2015).

1.4.3. Elementos integrativos y conjugativos (ICEs)

Los ICEs son elementos móviles capaces de integrarse y escindirse del cromosoma bacteriano, pudiendo transmitirse a otras células bacterianas de manera horizontal gracias a la maquinaria conjugativa que portan en su estructura. Al contrario que otros elementos móviles, la mayoría de ICEs solamente se integran en los cromosomas bacterianos, ya que no son capaces de replicarse y mantenerse de forma extracromosómica (Wozniak & Waldor, 2010), sin embargo, en los últimos años se han descrito algunos ICEs capaces de replicarse autónomamente de forma similar a los plásmidos (Johnson & Grossman, 2015).

Los ICEs están estructurados en tres módulos fundamentales, además de los genes accesorios que pueden portar (Sultan *et al.*, 2018): (i) un módulo de integración y escisión, (ii) un módulo de conjugación y (iii) un módulo de regulación. En determinadas

circunstancias y en respuesta a distintos estímulos, los ICEs se escinden del cromosoma, y pueden transmitirse a una célula receptora mediante conjugación gracias a la expresión del sistema de secreción tipo IV (T4SS). Resumidamente, el ICE se escinde desde el sitio *att* del cromosoma, y forma una molécula circular de ADN de doble cadena que posteriormente es procesada para dar lugar a una sola cadena de ADN. Este ADN se transfiere a una célula receptora mediante la formación del *pilus* de conjugación, gracias a la expresión del T4SS y a las relaxasas. Una vez transferido, el ICE recupera la doble cadena gracias a una DNA polimerasa, se recirculariza y se integra en el nuevo cromosoma mediante recombinación – la mayoría de los ICEs se integran mediante recombinación específica de sitio, en el sitio *att* – gracias a la integrasa que codifica el ICE. En la bacteria donadora, el ICE se replica mediante replicación de círculo rodante, volviendo a generar una molécula de doble cadena de ADN que vuelve a integrarse en el cromosoma (Johnson & Grossman, 2015). Este proceso está esquematizado en la Figura 7.

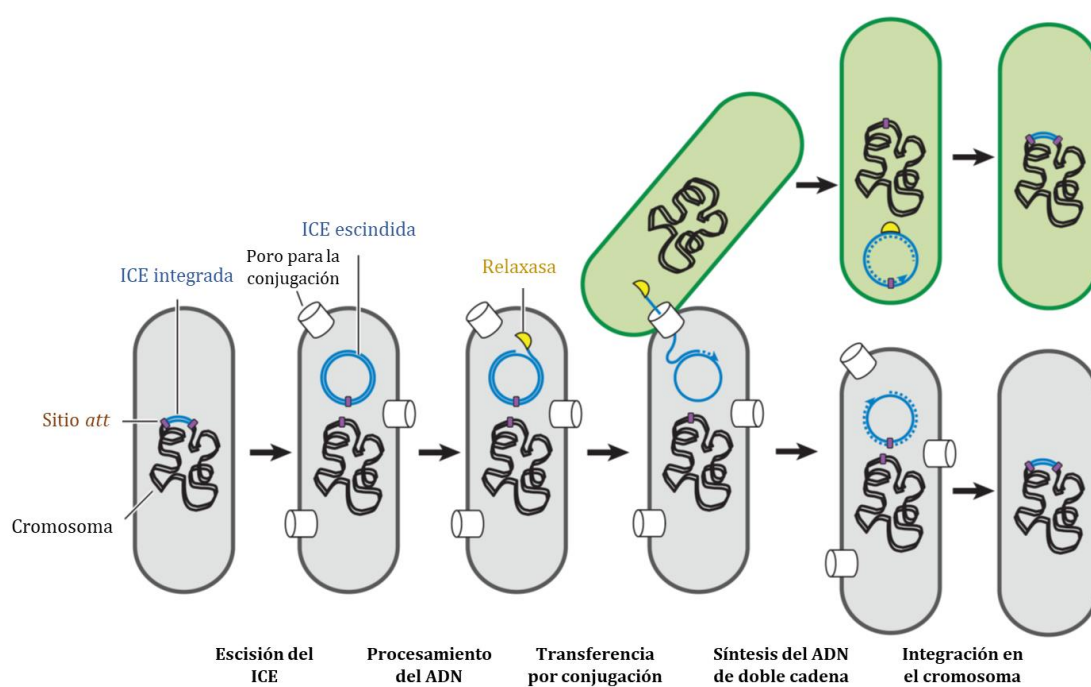


Figura 7. Representación del proceso por el que se movilizan los ICEs. Modificado de (Johnson & Grossman, 2015).

De esta forma, los ICEs permiten la diseminación de los genes codificados en su estructura, los cuales, al igual que ocurre con otros MGEs, pueden aportar ventajas adaptativas a la bacteria. Algunos de los fenotipos más comúnmente asociados a los ICEs son: resistencia a antibióticos, resistencia a metales pesados, degradación de compuestos aromáticos, fijación de nitrógeno, virulencia o formación de biofilms, entre otros (Johnson & Grossman, 2015; Sultan *et al.*, 2018).

1.4.4. Sistemas toxina-antitoxina (TA)

Los sistemas toxina-antitoxina son elementos genéticos ampliamente distribuidos en arqueas y bacterias. En estas últimas, se encuentran tanto en plásmidos como en los cromosomas, ejerciendo distintas funciones. Los sistemas TA son módulos de pequeño tamaño, formados por dos genes que codifican una toxina estable y una antitoxina inestable que neutraliza la actividad de la toxina. La antitoxina es más lábil que la toxina, siendo rápidamente degradada en condiciones de estrés, lo cual permite la liberación de la toxina para ejercer su acción sobre su diana bacteriana (Hayes, 2003; Yamaguchi *et al.*, 2011; Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014; Yang & Walsh, 2017).

Existen 6 tipos diferentes de sistemas TA en función del tipo de interacción que se produce entre la toxina y la antitoxina. En todos los casos, la toxina es una proteína, mientras que la antitoxina puede ser un ARN no codificante – en los tipos I y III – o una proteína de bajo peso molecular – en los tipos II, IV, V y VI (Sultan *et al.*, 2018).

El efecto de la toxina sobre la bacteria varía en función de dónde se localice el sistema TA:

- Cuando se encuentran localizados en plásmidos, los sistemas TA actúan como sistemas de muerte post-segregacional, promoviendo la estabilidad plasmídica (Figura 8). Cuando una de las células hijas no contiene una copia del plásmido, la antitoxina, que es más lábil que la toxina, se degrada rápidamente, y la toxina libre

ataca a su diana celular, provocando una inhibición del crecimiento o la muerte celular (Hayes, 2003; Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014; Yang & Walsh, 2017). Por ello, los sistemas TA tienen un rol crucial en la diseminación de la resistencia a antibióticos, ya que aumentan la estabilidad y el mantenimiento de plásmidos portadores de genes de resistencia en las poblaciones bacterianas. Más recientemente, se ha descubierto *mosAT*, un sistema TA que estabiliza un ICE, denominado SXT, que confiere resistencia a múltiples antibióticos en *Vibrio cholerae* (Wozniak & Waldor, 2009).

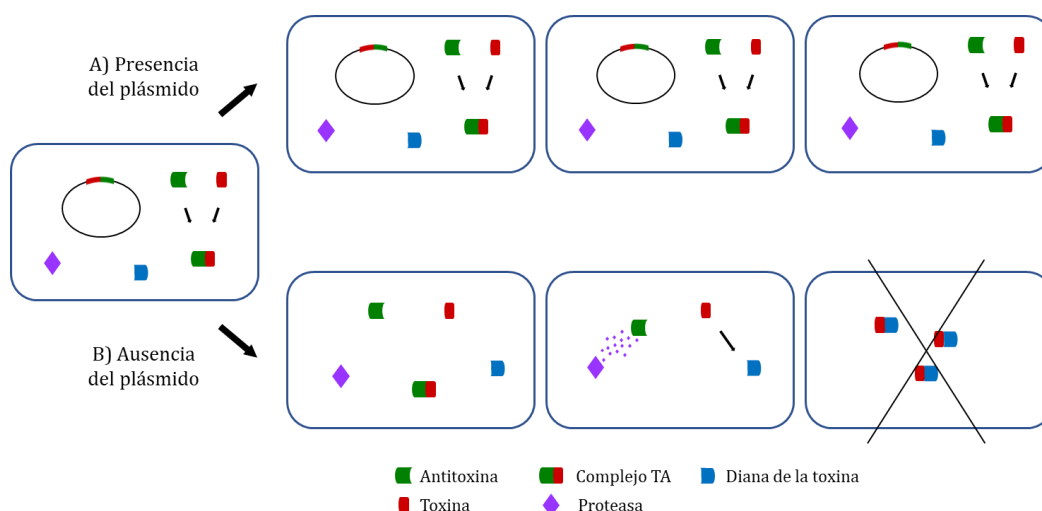


Figura 8. Funcionamiento de un sistema TA localizado en un plásmido para favorecer el mantenimiento del plásmido en la población tras la división celular. Modificado de (Hernandez-Arriaga *et al.*, 2014).

- Cuando se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano, los sistemas TA tienen un papel importante en la supervivencia celular en condiciones de estrés. En condiciones normales, la antitoxina se une a la toxina impidiendo que ésta ejerza su acción. Ante condiciones de estrés, la antitoxina es degradada por proteasas o ARNasas inducibles por estrés y la toxina es liberada, pudiendo disminuir la replicación del ADN, la síntesis proteica, la síntesis de la pared celular o la producción de ATP mientras dure el efecto tóxico (Yang & Walsh, 2017). Esta situación de estrés también puede ser provocada por la presencia de algunos

antibióticos, induciendo la síntesis de proteasas y la liberación de la toxina, y provocando que las bacterias entren en un estado de persistencia que les permite sobrevivir en presencia de dichos antibióticos (Yamaguchi *et al.*, 2011). De esta forma los sistemas TA cromosómicos contribuyen a la aparición de bacterias tolerantes a los antibióticos, y promueven su persistencia en las poblaciones.

Como conclusión de este capítulo, hemos visto que, gracias a la transferencia horizontal, las bacterias pueden adquirir y diseminar numerosos elementos genéticos móviles que confieren ventajas adaptativas a la bacteria, y que tienen un papel fundamental tanto en la evolución del genoma bacteriano como en la evolución y diseminación de la resistencia a antibióticos. En el siguiente capítulo me centraré en la descripción de los plásmidos, en su papel en la resistencia a antibióticos, y en los factores que influyen en el éxito de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.

CAPÍTULO 2. PLÁSMIDOS

2.1. Descripción de los plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico, con replicación autónoma independiente a la del cromosoma celular, presentes en todos los reinos de seres vivos (Phillips & Funnell, 2004). El término “plásmido” fue acuñado por el biólogo molecular norteamericano Joshua Lederberg en 1952, refiriéndose a determinantes heredables mantenidos fuera del cromosoma, lo que le valió el Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1958 (Lederberg, 1952). Posteriormente el término se modificó para referirse solamente a los determinantes con replicación autónoma que se mantienen exclusiva o predominantemente fuera del cromosoma bacteriano, evitando así confusión con los virus bacteriófagos.

La diversidad de plásmidos que se ha descrito hasta la fecha es inmensa, pudiendo variar en tamaño desde 1 kilobase (kb) hasta más de 1 megabase (Mb) , y en las copias en las que se encuentran en la bacteria, que pueden ir desde 1-2 hasta 200 plásmidos por célula (Million-Weaver & Camps, 2014). La gran mayoría de los plásmidos descritos tiene una estructura definida, formada por una región principal, donde se encuentran los genes necesarios para la replicación, segregación y movilización (en el caso de los plásmidos conjugativos y movilizables) y una región variable, que incluye todos los genes no esenciales que pueden aportar alguna ventaja adaptativa a la bacteria (Harrison & Brockhurst, 2012).

Los plásmidos son uno de los principales vectores en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos. No sólo eso, sino que también pueden actuar como vehículos de otros elementos genéticos asociados a genes de resistencia, como transposones, integrones o sistemas TA. Esto hace que los plásmidos tengan un papel crucial en la diseminación de la resistencia a antibióticos en patógenos clínicamente relevantes (Frost *et al.*, 2005; Stokes & Gillings, 2011; Carattoli, 2013; Partridge *et al.*, 2018; Sultan *et al.*, 2018). Además, muchas

de las asociaciones plásmido-bacteria que se producen resultan altamente exitosas, creando “superbacterias” que se diseminan rápidamente en ambientes hospitalarios y que suponen un alto riesgo para la población (San Millan, 2018). Algunos de estos ejemplos incluyen *Klebsiella pneumoniae* secuenciotipo 11 (ST11) y ST405 con el plásmido pOXA-48, que porta la carbapenemasa *bla*_{OXA-48} (Branas *et al.*, 2015) o *E. coli* ST131 complejo clonal C2/H30Rx asociada con plásmidos IncFII portadores de *bla*_{CTX-M} (Stoesser *et al.*, 2016).

2.2. Clasificación de los plásmidos

La gran diversidad de plásmidos hace que su clasificación sea compleja. Una de las primeras clasificaciones plasmídicas que se emplearon fue en función de su incompatibilidad, la cual refleja la capacidad de dos plásmidos de replicarse y mantenerse en el mismo hospedador (Couturier *et al.*, 1988). Si el sistema de replicación de dos plásmidos es muy similar, es decir, si dos plásmidos pertenecen al mismo grupo de incompatibilidad, durante la replicación se produce una interacción entre ambos plásmidos y se altera el número de copias plasmídicas, dando lugar a inestabilidad y finalmente a la pérdida de uno de los plásmidos (Novick, 1987). Sin embargo, la dificultad técnica y metodológica de esta clasificación hizo que empezaran a emplearse otras formas de clasificación de plásmidos. Algunas de las más usadas son las basadas en el replicón de los plásmidos o RT (*Replicon Typing*), analizado mediante hibridación de ADN (Couturier *et al.*, 1988) o mediante PCR (PBRT, *PCR-Based Replicon Typing*; Carattoli *et al.*, 2005). Esta clasificación basada en la replicación también se emplea para los plásmidos de bacterias Gram positivas, denominando a dichos grupos *rep* en función de la proteína *rep* que porten (Jensen *et al.*, 2010). Sin embargo, se ha comprobado que este método de clasificación solo incluye al 75% de los plásmidos descritos en enterobacterias, y tan solo a la mitad de los plásmidos de bacterias Gram positivas (Shintani *et al.*, 2015).

Otra clasificación plasmídica empleada actualmente se basa en los genes de movilidad plasmídica, que los clasifican en grupos MOB en función de las relaxasas, genes involucrados en la conjugación y movilización del plásmido (Francia *et al.*, 2004; Garcillan-Barcia *et al.*, 2009); no obstante, esta clasificación incluye solamente a los plásmidos transmisibles, que suponen alrededor del 50% en las γ -proteobacterias y del 35% en Firmicutes (Alvarado *et al.*, 2012).

En la actualidad, la gran cantidad de secuencias obtenidas gracias a la secuenciación masiva o WGS está permitiendo que se exploren nuevos métodos de clasificación plasmídica *in silico*, que quedan resumidos en el trabajo de Orlek y colaboradores (Orlek *et al.*, 2017).

De forma paralela a lo descrito anteriormente, los plásmidos pueden clasificarse en tres grandes grupos atendiendo a su capacidad para movilizarse mediante conjugación (Smillie *et al.*, 2010; Garcillan-Barcia *et al.*, 2011):

- Plásmidos conjugativos: son aquellos que portan toda la maquinaria necesaria para la conjugación, por lo que también se conocen como plásmidos auto-transmisibles. Esto incluye a cuatro componentes: las proteínas del T4SS (formadoras del poro de unión entre ambas bacterias), un origen de transferencia o *oriT*, relaxasas y proteínas acopladoras tipo 4 (T4CP). Los tres últimos componentes se engloban dentro del complejo MOB, el cual es esencial para el procesamiento correcto del ADN conjugado.
- Plásmidos movilizables: estos plásmidos solamente contienen el complejo MOB (con o sin proteínas acopladoras), pero carecen del T4SS, por lo que necesitan la presencia de un plásmido conjugativo en la misma célula para que forme el poro de unión y poder transmitirse por conjugación.

- Plásmidos no transmisibles: son aquellos que carecen de la maquinaria conjugativa, por lo que no son capaces de transmitirse por conjugación. Pueden transmitirse horizontalmente por transformación natural y por transducción.

Existe una asociación entre el tamaño de los plásmidos y su capacidad conjugativa (Smillie *et al.*, 2010). Smillie y colaboradores analizaron los plásmidos presentes en las bases de datos en el año 2010 y examinaron la distribución de dichos plásmidos en función de su tamaño y de su capacidad conjugativa (Figura 9). Dichas bases de datos han sido analizadas más recientemente, obteniendo resultados similares en cuanto a la distribución de los plásmidos (Shintani *et al.*, 2015).

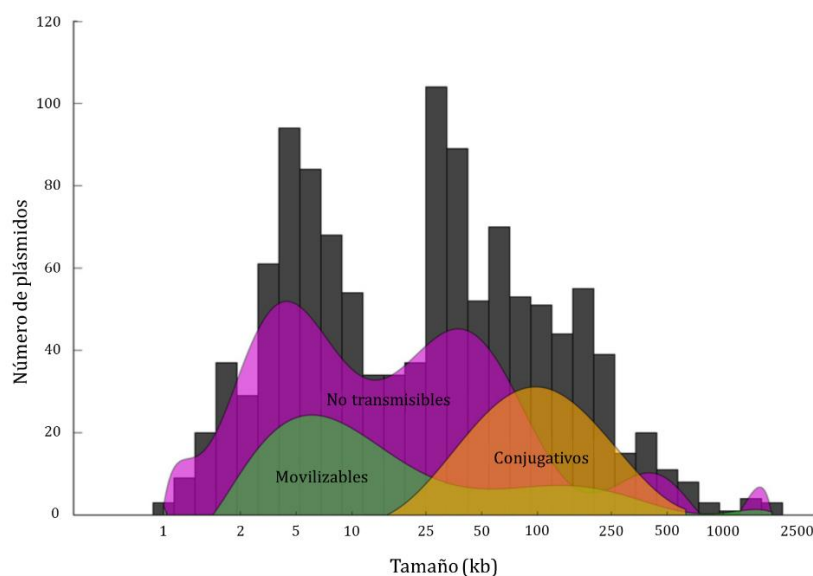


Figura 9. Distribución de los plásmidos conjugativos, movilizables y no transmisibles, disponibles en las bases de datos en el año 2010, en función de su tamaño. Modificado de (Smillie *et al.*, 2010).

En general, los plásmidos conjugativos son más grandes, con un tamaño medio de 100 kb, mientras que la mayoría de los plásmidos movilizables mide en torno a 5 kb. Los plásmidos no transmisibles tienen una distribución multimodal, con dos picos principales alrededor de 5 kb y 35 kb, y un pequeño pico en torno a 350 kb. Los dos primeros grupos probablemente se correspondan con plásmidos que se movilizan por transformación natural o por transducción, respectivamente, mientras que los plásmidos no transmisibles

mayores de 300 kb posiblemente derivan de plásmidos conjugativos que han perdido la maquinaria para conjugar y que muestran tendencia a acumular genes cromosómicos, pudiendo convertirse en cromosomas secundarios (Garcillan-Barcia *et al.*, 2011).

2.3. Éxito de los plásmidos en las poblaciones bacterianas

Como se ha comentado anteriormente, los plásmidos están ampliamente distribuidos en las poblaciones bacterianas, y constituyen uno de los principales vehículos de diseminación de genes de resistencia a los antibióticos.

La abundante presencia de plásmidos en los genomas bacterianos puede parecer lógica, puesto que portan genes que permiten la supervivencia y adaptación de sus hospedadores a determinados ecosistemas y ambientes, como la presencia de antibióticos o metales en el medio, la falta de nutrientes, etc., además de tener un papel importante en la ecología y evolución bacterianas (de la Cruz & Davies, 2000; Ochman *et al.*, 2000; Rankin *et al.*, 2011). Sin embargo, los plásmidos también suponen una carga para la bacteria que puede resultar perjudicial cuando se encuentra cohabitando con otras bacterias que no portan el plásmido. Esta carga es conocida como coste biológico o *fitness cost*.

2.3.1. Fitness cost de los plásmidos y otros MGEs

En general, los elementos genéticos adquiridos recientemente mediante transferencia horizontal requieren un periodo de adaptación al nuevo entorno genético, por lo que en las primeras fases muestran una regulación ineficiente y suponen un alto coste energético y fisiológico para la bacteria portadora (Baltrus, 2013). En el caso de los plásmidos de reciente adquisición, esto se manifiesta con una ralentización del crecimiento (o disminución del *fitness* bacteriano) y de la división bacteriana, lo que provoca una menor competitividad frente a otras bacterias carentes del plásmido en ambientes en los que no exista una presión

selectiva para los genes codificados en el plásmido (San Millan & MacLean, 2017; Gama *et al.*, 2018). Esta desventaja competitiva provocada por el mantenimiento del plásmido es lo que se define como coste biológico o *fitness cost* (ambos términos serán empleados como sinónimos a lo largo de este trabajo).

En los últimos años se han publicado varios trabajos que investigan y analizan el origen del coste biológico asociado a los plásmidos y otros elementos genéticos móviles, aunque a día de hoy todavía no se conocen todos los factores asociados al mismo, y qué mecanismos, dependientes en muchos casos de la asociación plásmido/hospedador, pueden ayudar a compensar este coste. En general, la mayoría de los plásmidos suponen un coste para la bacteria portadora, pero los efectos globales que ejercen sobre el *fitness* bacteriano están muy influenciados por el hospedador, por lo que es difícil predecir el comportamiento de un plásmido al ser adquirido por una nueva especie bacteriana (Gama *et al.*, 2018).

La revisión de San Millan y MacLean resume lo que se conoce hasta la fecha del coste biológico asociado a los plásmidos de reciente adquisición, analizando los procesos que pueden estar asociados a un aumento del coste metabólico en cada una de las fases biológicas del plásmido (San Millan & MacLean, 2017). Estos factores quedan ilustrados en la Figura 10.

Durante la **adquisición** de un nuevo plásmido, bien sea por transformación, transducción o, más frecuentemente, por conjugación, se produce un incremento de ADN de cadena sencilla en el interior celular. Esto produce un aumento transitorio de RecA, que induce la respuesta SOS de la bacteria, lo que, entre otros efectos, puede modificar la expresión génica e inhibir la división celular, dando lugar a una reducción del *fitness* bacteriano (Baharoglu & Mazel, 2014). Además, tras la adquisición de un nuevo plásmido, se ha visto que puede existir una sobreexpresión de genes plasmídicos regulados mediante *feedback* negativo, cuyos represores transcripcionales todavía no están regulados correctamente, y esta

sobreexpresión génica también puede dar lugar a un aumento transitorio del *fitness cost* plasmídico (Fernandez-Lopez *et al.*, 2014).

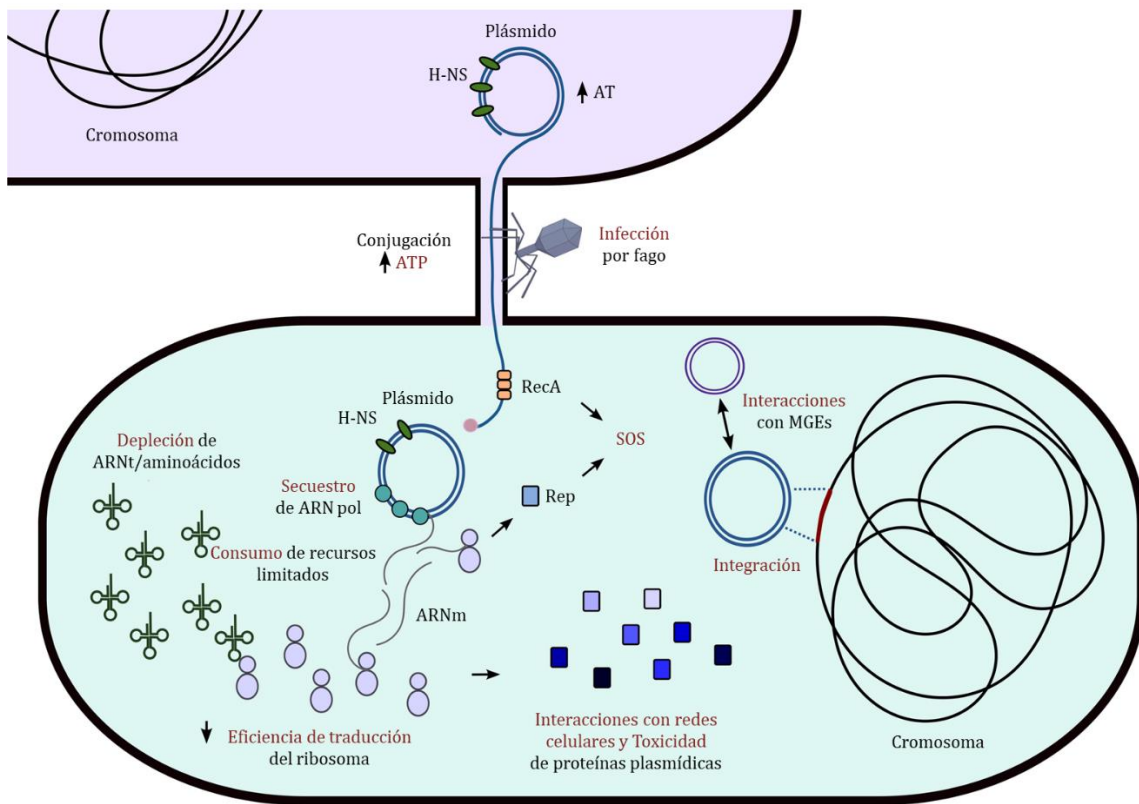


Figura 10. Efectos que la adquisición de plásmidos puede producir sobre la bacteria hospedadora y que pueden llevar asociado un *fitness cost*. Modificado de (San Millan & MacLean, 2017).

Una vez que una bacteria adquiere un plásmido, éste puede mantenerse de manera extracromosomal, pero también puede **integrarse** entera o parcialmente en el cromosoma bacteriano. La incorporación de ADN plasmídico en el cromosoma puede provocar la interrupción de genes relevantes y producir un coste metabólico en determinadas condiciones. Esto ocurre con ciertos ICEs, como Tn916, el cual se integra de forma prácticamente aleatoria en el cromosoma (Roberts & Mullany, 2009). Además, aunque en muchas ocasiones la integración de regiones plasmídicas se produce por recombinación homóloga con regiones similares del cromosoma, la adición de este nuevo material genético puede alterar la expresión de genes adyacentes, produciendo un coste para la bacteria (Baltrus, 2013).

Otro factor que puede afectar al *fitness* bacteriano es la **replicación** plasmídica. La expresión de la proteína Rep, encargada de controlar el número de copias en la mayoría de los plásmidos durante la replicación, puede verse alterada en los plásmidos de nueva adquisición, provocando el secuestro de maquinaria celular, como ADN polimerasas y helicasas, y retrasando la replicación del cromosoma. De hecho, un estudio comprobó que la sobre-expresión de proteína RepA del plásmido pSC101 era capaz de retrasar la división celular en *E. coli* gracias a la activación del sistema SOS bacteriano (Ingmer *et al.*, 2001).

Una de las principales causas del coste biológico asociado a los plásmidos y otros elementos móviles es la **expresión** de los genes que codifican. Por un lado, la transcripción y traducción de su material genético consume recursos celulares como carbono, nitrógeno y fósforo, así como energía en forma de ATP, que pueden alterar las reservas disponibles para procesos celulares (Baltrus, 2013). Además, durante la expresión de nuevos genes se produce un secuestro de maquinaria celular que puede retrasar otros procesos celulares. Algunos de los factores más relacionados con el aumento del coste metabólico son la ocupación y saturación de los ribosomas durante la traducción (Shachrai *et al.*, 2010), el consumo de las reservas de aminoácidos celulares (Bonomo & Gill, 2005), el desequilibrio entre los codones de los genes recientemente adquiridos y de los ARNt disponibles (Plotkin & Kudla, 2011), o el secuestro de la ARN polimerasa durante la transcripción, que se ha observado principalmente en regiones adquiridas con un porcentaje de AT elevado (Lamberte *et al.*, 2017).

Aparte del secuestro de maquinaria celular, la expresión de ciertas proteínas plasmídicas puede generar **citotoxicidad**, dando lugar a efectos tóxicos y deletéreos para la bacteria portadora. Por ejemplo, proteínas de nueva adquisición que nunca han estado en contacto con un determinado ambiente bacteriano presentan una mayor tendencia a un plegamiento incorrecto, que, en cantidades suficientes, puede derivar en estrés e incluso muerte celular por la despolarización de la membrana y la producción de radicales libres (Drummond &

Wilke, 2009). También son frecuentes los efectos tóxicos debidos a interacciones de las proteínas plasmídicas con redes celulares. Uno de los procesos más conocidos se denomina “hipótesis de complejidad”, que afirma que las proteínas con un mayor número de conexiones y que forman parte de procesos celulares complejos son transferidas mediante HGT con menor frecuencia que aquellas involucradas en procesos celulares simples o con menor número de conexiones (Cohen *et al.*, 2011). Esto parece ser debido a que los genes recién transferidos no han coevolucionado con el resto de los genes que forman parte de rutas celulares en el genoma y, por tanto, se transcriben de manera ineficiente. Además, proteínas homólogas a otras ya presentes en el cromosoma bacteriano pueden alterar la regulación de la fisiología celular e incluso crear nuevas conexiones que sean perniciosas para la bacteria (Baltrus, 2013).

Los plásmidos conjugativos también pueden suponer un coste extra para la bacteria portadora debido al proceso mismo de **conjugación**. Durante la conjugación debe formarse el poro de unión entre la célula donadora y la célula receptora, lo que supone una alta demanda de ATP (Ilangovan *et al.*, 2015). Sumado a la incorrecta regulación genética que puede existir en elementos móviles de reciente adquisición, la expresión de genes relacionados con la conjugación puede llegar a suponer un coste elevado para la bacteria. Por otro lado, la conjugación puede aumentar la tasa de infección por parte de ciertos bacteriófagos, que utilizan el T4SS para invadir las células bacterianas (Berry & Christie, 2011).

Como hemos visto, existen múltiples factores que pueden reducir el coste biológico de una bacteria portadora de un plásmido, y es la combinación e interacción entre estos factores la que va a determinar el efecto que un determinado plásmido producirá sobre el *fitness* de un hospedador concreto.

2.3.2. Existencia y persistencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas

En el apartado anterior hemos visto los múltiples efectos deletéreos que pueden provocar los plásmidos en las poblaciones bacterianas. Por ello, en presencia de presión selectiva en el medio – por ejemplo, en presencia de un antibiótico frente al cual el plásmido confiere resistencia – se esperaría que dicho gen de resistencia se integrara en el cromosoma, eliminando así el coste asociado a mantener la estructura plasmídica completa (Bergstrom *et al.*, 2000). De la misma forma, en ausencia de presión selectiva que favorezca su presencia, los plásmidos acabarán perdiéndose en la población debido al alto coste biológico que pueden suponer para la bacteria, de manera que, cuando aparezcan bacterias libres de plásmido en la población, éstas tendrán una ventaja competitiva con respecto a las que lo mantienen y acabarán desplazando de la población a las bacterias portadoras del plásmido, a no ser que, en el caso de los plásmidos conjugativos, éstos sean capaces de incrementar drásticamente su tasa de transferencia por conjugación para compensar su pérdida por el coste biológico y por segregación, lo cual, salvo algunas excepciones (Lundquist & Levin, 1986), no ocurre (Bergstrom *et al.*, 2000).

Por tanto, explicar la elevada persistencia y diversidad de los plásmidos en las poblaciones bacterianas presenta un reto que hasta la fecha, pese a ser ampliamente investigado, no se ha llegado a esclarecer (Carroll & Wong, 2018).

2.3.2.1. *Mecanismos de estabilización plasmídica*

Ante la llegada de un nuevo plásmido a una célula, hemos visto que pueden producirse numerosas interacciones que perjudican el *fitness* bacteriano. Sin embargo, existen mecanismos que ayudan a reducir dicho coste biológico.

Muchos plásmidos conjugativos, como el plásmido F o los pertenecientes a la familia IncN, portan la proteína PsiB, la cual es un potente inhibidor de la respuesta SOS que se genera

tras la conjugación y adquisición de un nuevo plásmido (Simmons *et al.*, 2008). PsiB actúa uniéndose a RecA y por tanto impide la activación del operón del SOS.

También hemos mencionado que una sobreexpresión de los genes relacionados con la conjugación puede aumentar el coste biológico de los plásmidos. Por ello, una vez que el plásmido está establecido en la población, la expresión de los sistemas de conjugación está finamente regulada. En general estos genes se encuentran reprimidos en la mayoría de las bacterias, con solo un pequeño número de células en la población que expresan la maquinaria conjugativa, y con mecanismos de señalización y comunicación entre las bacterias para activar el sistema conjugativo en respuesta a determinadas señales o condiciones ambientales (Koraimann & Wagner, 2014).

Uno de los principales costes asociados a los plásmidos es la expresión de los genes codificados en los mismos. Por ello, tanto plásmidos como bacterias poseen sistemas que regulan esta expresión. Unas de las proteínas reguladoras celulares más conocidas son las proteínas H-NS (*Histone-like Nucleoid Structuring protein*). Estas proteínas actúan como silenciadoras de genes con un alto porcentaje de AT, lo cual es característico de promotores y de MGEs. Es curioso que muchos plásmidos conjugativos también portan genes similares a estas proteínas H-NS para regular la expresión de sus propios genes y favorecer su persistencia en la célula (Banos *et al.*, 2009).

Por otro lado, existen varios mecanismos que, pese a no reducir el coste biológico de los plásmidos, ayudan a mantenerlos en las poblaciones (por tanto, dando tiempo a que tengan lugar otros mecanismos que mitiguen dicho coste) incluso en ausencia de presión selectiva que favorezca la persistencia del plásmido. Muchos plásmidos portan sistemas que aseguran o, al menos, favorecen su presencia en ambas células hijas durante la división bacteriana (Zielenkiewicz & Ceglowski, 2001; Million-Weaver & Camps, 2014). Estos sistemas pueden dividirse en tres categorías:

- a) Sistemas de partición activa: estos sistemas, típicos de plásmidos con un bajo número de copias, se encargan de distribuir los plásmidos en ambos extremos de la bacteria previamente a la división celular, de forma que, tras su división, haya al menos una copia del plásmido en cada una de las células hijas (Baxter & Funnell, 2014). Algunos ejemplos son el sistema *parRMC* del plásmido R o el sistema *sopABC* del plásmido F.
- b) Sistemas de muerte post-segregacional: estos sistemas son módulos TA, que ya han sido descritos en el apartado 1.4.4., y que actúan eliminando selectivamente a aquellas bacterias que no han recibido ninguna copia del plásmido tras la división celular.
- c) Sistemas de resolución de dímeros: los plásmidos con un número de copias elevado (> 15 copias/célula) carecen de sistemas de partición activa, y es generalmente aceptado que su distribución en las células hijas es estocástica. Una manera de incrementar su estabilidad es mediante sistemas de resolución de los dímeros de plásmidos que se forman durante la replicación plasmídica (Summers *et al.*, 1993). Estos sistemas consisten en procesos de recombinación específica de sitio para resolver los dímeros de plásmidos formados durante la replicación plasmídica y dar lugar a monómeros, de manera que aumente el número de copias plasmídicas disponible durante la división celular y, por tanto, aumente la probabilidad de heredar al menos una copia del plásmido. Más adelante hablaremos de éstos y otros sistemas que aumentan la estabilidad de los plásmidos con un alto número de copias.

2.3.2.2. La evolución adaptativa como mecanismo de compensación del coste biológico

Numerosos trabajos han puesto en evidencia la importancia de la evolución compensatoria como mecanismo de estabilización plasmídica (Bouma & Lenski, 1988; Modi & Adams,

1991; Modi *et al.*, 1991; Turner *et al.*, 1998; Dahlberg & Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005; De Gelder *et al.*, 2008; Sota *et al.*, 2010; San Millan *et al.*, 2014b; Harrison *et al.*, 2015; San Millan *et al.*, 2015a; Porse *et al.*, 2016). Si bien la gran mayoría de los plásmidos provoca una reducción del *fitness* bacteriano cuando son adquiridos, esta reducción puede ser compensada mediante la coevolución entre plásmido y hospedador (Harrison & Brockhurst, 2012; Figura 11).

La aparición de mutaciones adaptativas en plásmidos y hospedadores puede observarse en el laboratorio mediante evoluciones experimentales en ambientes controlados (Cooper, 2018). En estas evoluciones se realizan pases seriados de una población bacteriana portadora de, en este caso, un plásmido, pudiendo añadir presión selectiva al medio para forzar el mantenimiento del plásmido en la población. Gracias al tamaño elevado de la población y al corto tiempo de generación de las bacterias, podremos observar la aparición de fenómenos evolutivos que den lugar a variantes genéticas mejor adaptadas al ambiente en el que se han multiplicado (Barrick & Lenski, 2013). En nuestro caso, podremos observar mutaciones evolutivas que favorezcan la adaptación del plásmido a la población bacteriana con la que ha evolucionado, y podremos analizar qué respuestas adaptativas se han producido tanto a nivel bacteriano como a nivel plasmídico (MacLean & San Millan, 2015).

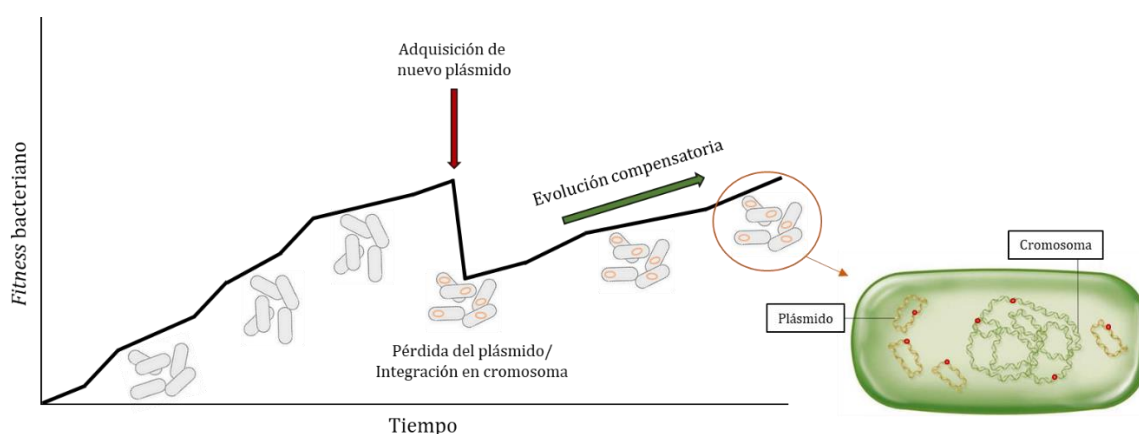


Figura 11. Representación de la mejora en el *fitness* bacteriano tras la evolución compensatoria entre plásmido y hospedador. Cuando una población bacteriana adquiere un nuevo plásmido, éste provoca una disminución del *fitness* bacteriano, que puede dar lugar a la pérdida del plásmido en la población, o bien a la integración de los genes plasmídicos beneficiosos en el cromosoma. Durante la evolución del hospedador con el plásmido, el coste biológico asociado al plásmido puede reducirse e incluso desaparecer gracias a la aparición de mutaciones compensatorias en plásmido, cromosoma o ambos.

En general, existen cuatro mecanismos principales por los que la coevolución plásmido/hospedador puede facilitar la disminución del coste biológico asociado a los plásmidos (Harrison & Brockhurst, 2012; San Millan *et al.*, 2015a): disminución de la tasa de conjugación, disminución del número de copias plasmídicas, pérdida de genes plasmídicos “accesorios” y cambios en la expresión génica. Estos mecanismos pueden deberse tanto a mutaciones cromosómicas como plasmídicas, aunque en muchos casos aparecen como fenómenos de coadaptación, en los que se producen cambios adaptativos a ambos niveles (cromosómicos y plasmídicos) que contribuyen a mejorar el *fitness* bacteriano (Harrison & Brockhurst, 2012). Comparando las mejoras en el *fitness* entre plásmidos y hospedadores evolucionados y ancestrales puede determinarse si la adaptación se ha producido a nivel plasmídico, cromosómico o a ambos niveles de forma generalizada (cuando la mejora es a ambos niveles por separado y en conjunto) o especializada (cuando los cambios a nivel individual no generan una ventaja, pero el conjunto de cambios a ambos niveles sí mejoran el *fitness*; Figura 12). Algunos de estos trabajos están resumidos en la Tabla 1.

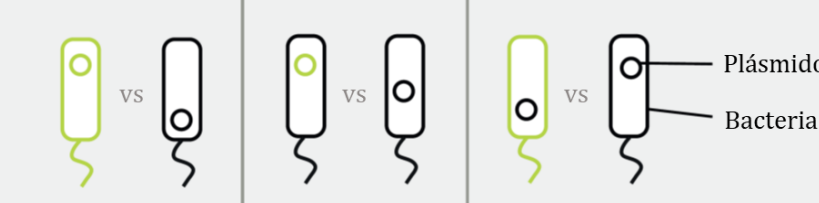
Ensayos de competición			
	(a)	(b)	(c)
Cambio fenotípico relativo observado	1	↑	↑ = Adaptación plasmídica
	2	↑	= = Adaptación bacteriana
	3	↑	↑ = Co-adaptación generalizada
	4	↑	↓ = Co-adaptación especializada

Figura 12. Tipos de cambios adaptativos, que mejoran el *fitness* bacteriano, que pueden ocurrir en un experimento de evolución compensatoria. Modificado de (Harrison & Brockhurst, 2012).

Tabla 1. Resumen de trabajos en los que la evolución compensatoria aumenta el fitness bacteriano al reducir el coste biológico asociado a los plásmidos. Los dos últimos describen fenómenos de epistasis.

REFERENCIA	BACTERIA	PLÁSMIDO	FITNESS INICIAL	FITNESS FINAL	PORTE ADAPTADA	CAMBIOS OBSERVADOS
(Turner <i>et al.</i> , 1998)	<i>E. coli</i>	pB15 ^c	↓ 1,1% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 16,9% (b ₁ p ₁ vs b ₀)	No especificado	Pérdida de capacidad conjugativa y de resistencia a tetraciclina
(Harrison <i>et al.</i> , 2015)	<i>P. fluorescens</i>	pQBR103 ^c	↓ 27% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 10,7-120% (b ₁ p ₁ vs b ₀ p ₀)	Bacteria	Mutaciones en sistema <i>gacA/gacS</i> reducen la expresión del 17% de genes cromosómicos y plasmídicos
(Bouma & Lenski, 1988)	<i>E. coli</i>	pACYC184 ^N	↓ 5,5% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 10,6-17,1% (b ₁ p ₀ vs b ₁)	Bacteria	No analizan las mutaciones
(San Millán <i>et al.</i> , 2014b)	<i>P. aeruginosa</i>	pNUK73 ^N	↓ 21,4% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	Compensación total del coste asociado al plásmido	Bacteria	Mutaciones en quinasa y helicasa disminuyen la transcripción de genes a valores originales, incluyendo genes del SOS
(San Millán <i>et al.</i> , 2015a)	<i>H. influenzae</i>	pB1000 ^M	↓ 5,67% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	Compensación total del coste asociado al plásmido	Ambas	Disminución del número de copias plasmídicas
(Porse <i>et al.</i> , 2016)	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i>	pKP33 ^c	↓ 4,6-14% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	Compensación total del coste asociado al plásmido en 2 de 3 cepas	Plásmido	Deleción de 25 kb de la secuencia plasmídica, que incluye genes de la conjugación
(De Gelder <i>et al.</i> , 2008)	<i>S. maltophilia</i>	pB10 ^c	↓ 42-50,7% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 9,1-12,5% (b ₀ p ₁ vs b ₀)	Plásmido	Cambio de aa 95 de TrbC, que participa en la conjugación. Expansión del rango de hospedador
(Sota <i>et al.</i> , 2010)	<i>S. oneidensis</i>	pMS0506 ^M	-	↑ 5,3-9,68% (b ₀ p ₁ vs b ₀ p ₀)	Plásmido	Mutaciones en la proteína de replicación TrfA1, aumentan el PCN. Cambio del rango de hospedador
(Modi & Adams, 1991)	<i>E. coli</i>	pBR322Δ5 ^N	↓ 12,3-6,2% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 6,6-45,3% (b ₁ p ₁ vs b ₀ p ₀)	Plásmido y ambas	No analizan las mutaciones
(Modi <i>et al.</i> , 1991)	<i>E. coli</i>	pBR322Δ5 ^N	↓ 14-19% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ 17-25% (b ₀ p ₁ vs b ₀ p ₀) y 51-87% (b ₁ p ₁ vs b ₁ p ₀)	Plásmido y ambas	Deleción de 2,25 kb de secuencia plasmídica, que incluye gen <i>tet</i> , y mutaciones cromosómicas
(Dahlberg & Chao, 2003)	<i>E. coli</i>	R1 ^c , RP4 ^c	↓ 5,8-20,8% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ Hasta 70% (b ₁ p ₁ vs b ₀ p ₀)	Ambas	Salto de ISs cromosómicas al plásmido, en genes de resistencia y en <i>oriV</i> , y deleción de otra IS
(Dionisio <i>et al.</i> , 2005)	<i>E. coli</i>	R1 ^c , RP4 ^c	↓ 31,7% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	↑ Hasta 45,3% (b ₁ p ₁ vs b ₀ p ₀)	Ambas	Expansión del rango de hospedador
(Silva <i>et al.</i> , 2011)	<i>E. coli</i>	R124 ^c , R831 ^c , R16 ^c , R702 ^c , RP4 ^c	↓ 2,8-8% (b ₀ p ₀ vs b ₀) y 0,5-7,5% (b ₁ vs b ₀)	52% de interacciones con epistasis positiva; 3 combinaciones compensan totalmente el coste de ambos determinantes de resistencia	Epistasis entre plásmidos y bacteria	
(San Millán <i>et al.</i> , 2014a)	<i>P. aeruginosa</i>	pNI105 ^N , pBS228 ^M , Rms149 ^M , pAKD1 ^c , PAMBL-1 ^c , PAMBL-2 ^c	↓ 0-14,3% (b ₀ p ₀ vs b ₀)	4/5 combinaciones con epistasis positiva; 3/5 combinaciones pNI105 compensa totalmente su coste	Epistasis entre plásmidos	

b₀ = bacteria ancestral; b₁ = bacteria evolucionada; p₀ = plásmido ancestral; p₁ = plásmido evolucionado; PCN = Número de copias plasmídicas

↓ = disminución del *fitness* bacteriano; ↑ = aumento del *fitness* bacteriano

^c = plásmido conjugativo; ^M = plásmido movilizable; ^N = plásmido no transmisible

Existen ejemplos en la literatura en los que se describe la adaptación y reducción del *fitness cost* plasmídico debidos a mutaciones compensatorias a lo largo del **cromosoma bacteriano** (Bouma & Lenski, 1988; San Millan *et al.*, 2014b; Harrison *et al.*, 2015). El plásmido pQBR103, que inicialmente reduce el *fitness* de *Pseudomonas fluorescens* en un 27%, compensa totalmente su coste biológico gracias a mutaciones cromosómicas en el sistema de dos componentes *gacS/gacA*, adquiridas de forma paralela en evoluciones experimentales independientes (Harrison *et al.*, 2015). Las mutaciones en estos genes provocan una disminución de la expresión del 17% del total de genes cromosómicos y plasmídicos – muchos de los cuales están relacionados con la síntesis proteica – comparados con los niveles de expresión del hospedador con el plásmido original. Esto lleva a los autores a hipotetizar que, ante la llegada de un plásmido a un nuevo entorno genético, muchos de los productos plasmídicos tienen efectos tóxicos para la bacteria (de hecho, en la bacteria portadora del plásmido sin evolucionar el 16,7% de los genes cromosómicos tienen una expresión mayor a la bacteria libre del plásmido), y que estos efectos deletéreos son compensados al regular negativamente su transcripción y traducción, recuperando unos niveles de expresión similares al hospedador original.

Otro ejemplo de mutaciones cromosómicas compensatorias lo encontramos en el plásmido pNUK73, que compensa totalmente su coste en *Pseudomonas aeruginosa* gracias a mutaciones cromosómicas en los genes codificantes de una quinasa y una helicasa (San Millan *et al.*, 2014b). En este caso, sin embargo, observan que la total estabilización del plásmido en la población requiere cierta presión selectiva sobre el plásmido, además de las mutaciones compensatorias. Los autores sugieren que la interacción entre ambos factores es la que estabiliza el plásmido en la población: las mutaciones compensatorias aumentan la persistencia del plásmido, mientras que la presión selectiva de forma puntual elimina a los segregantes sin plásmido y facilita la aparición de mutaciones adaptativas, que terminan por eliminar totalmente el coste asociado al plásmido. Curiosamente, al igual que en el estudio anterior, la desregulación de los niveles transcripcionales es responsable del coste

biológico asociado a la adquisición del plásmido. La bacteria portadora del plásmido original presenta un incremento en la transcripción y expresión del 13% del total de genes bacterianos, incluyendo la proteína Rep plasmídica y los genes involucrados en la respuesta SOS; gracias a las mutaciones aparecidas en la quinasa y la helicasa tras la evolución compensatoria, estos genes regresan a sus valores transcripcionales normales, lo que revierte el coste asociado al plásmido y lo estabiliza en la población (San Millan *et al.*, 2015b).

También existen casos en los que solamente **mutaciones compensatorias en la estructura del plásmido** son capaces de compensar totalmente su coste y aumentar su estabilidad sin cambios en el cromosoma bacteriano asociados con una disminución del coste del plásmido. Es el caso del plásmido conjugativo pKP33, que inicialmente tiene un coste entre 4,6% y 14% al ser adquirido por nuevos hospedadores (dicho coste no se observa en su hospedador original, probablemente resultado de haber coevolucionado durante un largo periodo), y que tras una evolución experimental con presión selectiva es capaz de compensar totalmente su coste mediante la delección de un fragmento de 25 kb del plásmido, que incluye los genes del sistema T4SS, responsable de la conjugación autónoma del plásmido (Porse *et al.*, 2016). Esta delección ocurre por recombinación entre el elemento transponible IS26, que flanquea ambos extremos del fragmento delecionado. De esta forma, pese a reducir sus posibilidades de transmisión horizontal al perder el sistema de conjugación, el plásmido es capaz de reducir el coste que impone a la bacteria para permanecer durante más tiempo en la población – recordemos que los plásmidos conjugativos de gran tamaño suelen portar otros sistemas que favorecen su estabilidad. Curiosamente, esta adaptación solo ocurre al evolucionar pKP33 en dos de los tres hospedadores en los que analizan la estabilidad de pKP33, lo que muestra una vez más que las diferentes estrategias evolutivas que pueden darse dependen tanto del plásmido como del entorno genético en el que evoluciona. Algo similar ocurre en el trabajo de 1998 de

Turner y colaboradores, en el que observan que los plásmidos que evolucionan hacia menores tasas de conjugación imponen un coste biológico menor al plásmido ancestral, mientras que los que incrementan dichas tasas suponen un coste mayor (Turner *et al.*, 1998).

La compensación del coste biológico a través de deleciones plasmídicas también se ha descrito en el plásmido pBR322Δ5, el cual compensa su coste gracias a la delección de un fragmento de 2,25 kb que incluye un gen *tet* de resistencia a tetraciclina, eliminando así el coste producido por la expresión de genes plasmídicos “prescindibles” en ausencia de presión selectiva (Modi *et al.*, 1991).

La modulación del número de copias plasmídicas también se ha descrito como mecanismo de reducción del coste biológico (San Millan *et al.*, 2015a). En nuestro trabajo del año 2015 describimos cómo la evolución de pB1000 en *H. influenzae* en ausencia de presión antibiótica permitió la compensación total del coste biológico asociado al plásmido, y comprobamos que dicha reducción del *fitness cost* fue debida a una disminución del número medio de copias plasmídicas de 44,5 a 18,43. Al secuenciar las poblaciones evolucionadas, no obstante, no encontramos ninguna mutación asociada a la reducción del PCN. Esto podría sugerir que, a lo largo de la evolución, las bacterias que redujeron su número de copias plasmídicas sin llegar a comprometer la estabilidad de pB1000 en la población fueron seleccionadas por la ventaja competitiva que presentaban frente a las bacterias que portaban un número de copias más elevado.

Como hemos dicho, en muchos casos **tanto cromosoma como plásmido** adquieren mutaciones que colaboran para mejorar el *fitness* bacteriano. Es el caso del trabajo de Dalberg y Chao, que observaron una reducción generalizada del coste biológico de los plásmidos R1 y RP4 tras un experimento evolutivo de 1.100 generaciones en *E. coli* (Dahlberg & Chao, 2003). Tras analizar cromosomas y plásmidos por separado, concluyen

que la disminución del coste está atribuida a mutaciones compensatorias tanto en el cromosoma como en los plásmidos, pero que ambos eventos son capaces de compensar el coste del plásmido de manera independiente. *A priori*, la concurrencia de mutaciones compensatorias en bacteria y plásmidos del mismo clon parece redundante, ya que ambas compensan el coste metabólico del plásmido por separado. Estos autores sugieren que tanto las mutaciones cromosómicas como las plasmídicas son seleccionadas evolutivamente, pero con distintos propósitos: las mutaciones plasmídicas son seleccionadas porque aumentan el *fitness* bacteriano, mientras que las mutaciones del hospedador están encaminadas a mejorar la adaptación al medio y el crecimiento bacteriano, siendo la reducción del coste plasmídico un efecto colateral (Dahlberg & Chao, 2003).

Ambos tipos de mutaciones compensatorias, cromosómicas y plasmídicas, están claramente relacionadas con la adaptación y persistencia de los plásmidos en las poblaciones. No obstante, un estudio reciente señala que las mutaciones localizadas en los elementos móviles son más relevantes en el incremento de la estabilidad plasmídica (Zwanzig *et al.*, 2019). Esto se debe a que, mientras que las mutaciones cromosómicas se heredan únicamente de forma vertical, las mutaciones en los plásmidos son heredadas de forma tanto vertical como horizontal, permitiendo que el plásmido tenga un coste asociado reducido al ser adquirido por un nuevo hospedador. Además, la compensación del coste asociado a un plásmido puede favorecer la adquisición de otros replicones de la misma familia sin ningún coste adicional, como ocurre con pB1000 y los plásmidos pB1005 y pB1006 (Santos-Lopez *et al.*, 2017b).

Por otro lado, las mutaciones compensatorias cromosómicas también son claramente relevantes. Debido a la diferencia de tamaño entre cromosoma y plásmido, pueden aparecer mutaciones compensatorias en genes cromosómicos con mayor frecuencia, lo que permitiría una reducción del coste biológico inicial del plásmido y evitaría su rápida pérdida en la población, aumentando el tiempo disponible para la aparición de otro tipo de

mutaciones compensatorias (Zwanzig *et al.*, 2019). Otra ventaja de este tipo de mutaciones cromosómicas es que, al contrario que los plásmidos compensados, que pueden perderse de manera estocástica, son mantenidas de manera vertical. Esto puede suponer que, en el caso de que una célula pierda sus copias plasmídicas, la adquisición de un replicón del mismo grupo no lleve asociado ningún coste, ya que dicho coste biológico ya ha sido compensado previamente (MacLean & Vogwill, 2014).

Probablemente, el equilibrio y la colaboración entre ambos tipos de mutaciones compensatorias, cromosómicas y plasmídicas, sea un factor determinante para explicar la elevada diversidad y mantenimiento de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.

2.3.2.3. *Interacciones epistáticas que reducen el coste biológico de los plásmidos*

La epistasis o interacción génica es un fenómeno frecuente y relevante en la variación y evolución de sistemas genéticos (Phillips, 2008). Cuando nos referimos al *fitness* bacteriano, pueden ocurrir interacciones epistáticas de tres tipos: i) epistasis positiva, en la que la presencia de un gen/mutación favorece la presencia de otro, ii) epistasis negativa, en la que la presencia de uno perjudica la presencia del otro, dándose un efecto antagónico, y iii) epistasis distintiva, en la que un gen/mutación tiene un efecto variable sobre el otro en función del contexto celular en el que se encuentren (Wong, 2017).

Existen ejemplos en los que el coste de un plásmido es compensado gracias a fenómenos epistáticos positivos entre varios plásmidos cohabitando la misma célula (Figura 13). En un modelo experimental en *P. aeruginosa*, San Millan y colaboradores combinaron la presencia de un plásmido pequeño multicopia con 5 plásmidos grandes (dos movilizables y tres conjugativos) y, analizando el *fitness cost* de los plásmidos por separado y cohabitando, comprobaron que, en 4 de las 5 asociaciones, el coste asociado a portar dos plásmidos era menor a la suma de los costes de cada plásmido habitando la célula de forma independiente, es decir, observaron interacciones epistáticas positivas entre los plásmidos (San Millan *et*

al., 2014a). Además, comprobaron mediante evolución experimental que pNI105, el plásmido pequeño multicopia, aumentaba significativamente su estabilidad al evolucionar en presencia de cualquiera de los plásmidos grandes.

Esta observación llevó a los autores a analizar la distribución de los plásmidos en los genomas secuenciados hasta la fecha, pudiendo observar que las bacterias portando más de dos plásmidos son más frecuentes de lo que se esperaría si los plásmidos se distribuyeran de manera aleatoria (San Millan *et al.*, 2014a).

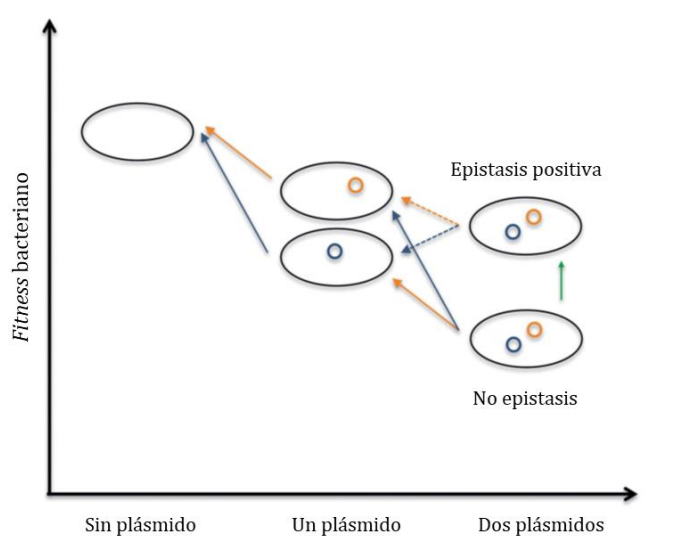


Figura 13. Representación de epistasis positiva entre dos plásmidos. El *fitness* bacteriano decrece debido al coste metabólico de portar uno o dos plásmidos. En este ejemplo, cuando dos plásmidos cohabitan en la misma célula, el coste biológico asociado a los plásmidos puede ser multiplicativo (en caso de que no exista epistasis) o menor (en caso de epistasis positiva). En el caso de no haber epistasis, la pérdida de uno de los plásmidos mejorará el *fitness* bacteriano; en el caso de haber epistasis positiva, la ventaja de perder uno de los plásmidos será menor, e incluso puede llegar a perjudicar el *fitness* bacteriano (en la figura, el *fitness* de la bacteria portadora del plásmido azul es menor que el de la bacteria portando ambos plásmidos con epistasis positiva). Modificado de (San Millan *et al.*, 2014a).

Pero este fenómeno no se limita exclusivamente a interacciones plasmídicas, puesto que también se han descrito interacciones epistáticas entre plásmidos y genes cromosómicos.

En 2011, Silva y colaboradores observaron que tanto la presencia de mutaciones cromosómicas en *E. coli* – que afectaban a los genes *gyrA*, *rpoB* y *rpsL*, relacionados con procesos celulares de replicación, transcripción y traducción respectivamente, y que producían un aumento en la resistencia frente a distintos antibióticos – como la presencia

de cinco plásmidos conjugativos portadores de genes de resistencia – R124, R831, R16, R702 y RP4 – afectaban negativamente al *fitness* bacteriano en distintas proporciones. No obstante, al realizar combinaciones entre las mutaciones en los genes cromosómicos y los plásmidos, observaron que más del 50% de dichas combinaciones presentaban epistasis positiva, es decir, que el coste biológico de portar ambos determinantes de resistencia era menor que la suma del coste de cada determinante por separado. Es más, casi el 80% de estas interacciones positivas implicaban que el coste de portar un plásmido y una mutación cromosómica era menor que el coste de portar solo uno de los determinantes (Silva *et al.*, 2011). Este fenómeno es interesante, puesto que no solamente supone un aumento de estabilidad del plásmido en la población (como hemos visto en los ejemplos de evolución compensatoria), sino que en este caso tanto los plásmidos como las mutaciones cromosómicas aportan resistencia a antimicrobianos, y gracias a la epistasis entre ambos determinantes, se produce una coselección de ambos mecanismos de resistencia que por separado probablemente se acabarían perdiendo, mientras que al encontrarse en la misma bacteria compensan su coste y se estabilizan en la población.

Por tanto, las interacciones epistáticas entre plásmidos (San Millan *et al.*, 2014a) y con el cromosoma (Silva *et al.*, 2011) aportan nueva luz sobre la persistencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas. Además, si este fenómeno es frecuente en la naturaleza, podría ser un factor importante en la prevalencia y persistencia de bacterias multirresistentes en poblaciones que no son expuestas a presión antibiótica.

2.3.2.4. *Interferencia clonal durante la evolución experimental*

En los últimos años, gracias al desarrollo y abaratamiento de las plataformas de secuenciación masiva, han podido estudiarse las dinámicas genéticas que aparecen durante los ensayos de evolución experimental de una población bacteriana, pudiendo analizar las distintas variantes genéticas que surgen a lo largo de la evolución (Barrick & Lenski, 2009).

Esto ha permitido observar que, en varios casos, la interferencia clonal puede tener un papel relevante en la coevolución de los plásmidos con sus hospedadores. La interferencia clonal ocurre cuando, en una población sometida a presión selectiva, aparecen simultáneamente varios genotipos con mutaciones beneficiosas diferentes (Gerrish & Lenski, 1998). Dichas variantes compiten entre ellas, lo que provoca un aumento del tiempo de fijación de las variantes genéticas, hasta que, finalmente, la/las mutaciones que confieran la mayor ventaja en términos de *fitness* se fijen en la población, eliminando eventualmente al resto de los genotipos (Barrick & Lenski, 2009; Hughes *et al.*, 2012; Barrick & Lenski, 2013; Figura 14).

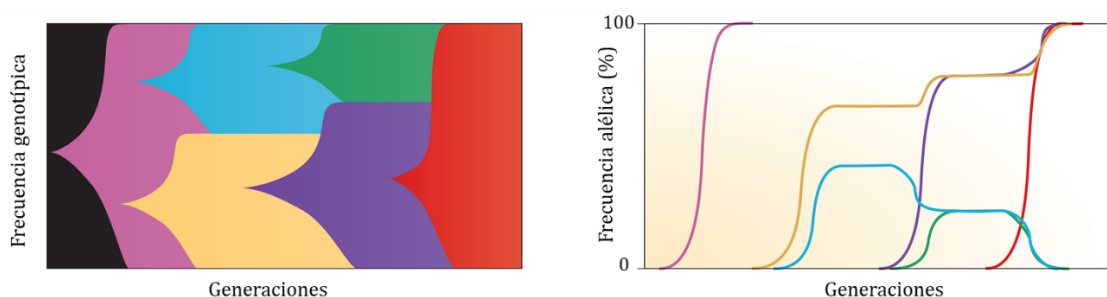


Figura 14. Interferencia clonal durante una evolución experimental, en el que aparecen distintos genotipos (izquierda), que representan un determinado porcentaje de la población (derecha), hasta que finalmente el genotipo que provea la mayor ventaja adaptativa queda fijado y el resto son eliminados. Modificado de (Barrick & Lenski, 2013).

Hughes y colaboradores (2012) observaron fenómenos de interferencia clonal en la adaptación del plásmido pMS0506 a su nuevo hospedador *Shewanella oneidensis* (Hughes *et al.*, 2012). Previamente habían observado que, tras una evolución adaptativa de 1.000 generaciones, el plásmido aumentaba su estabilidad adquiriendo diversas mutaciones en la región 5' del gen *trfA1* del plásmido, codificante de la proteína iniciadora de la replicación plasmídica (Sota *et al.*, 2010). Al analizar mediante PCR los distintos genotipos aparecidos en dicha región en varios momentos a lo largo de las evoluciones, detectaron la presencia de al menos 40 genotipos diferentes, muchos de los cuales coexistieron durante un tiempo a elevadas frecuencias. No obstante, tras 1.000 generaciones, solo uno o dos genotipos dominaban en la población final. Estos genotipos estaban asociados con el aumento de estabilidad del plásmido, lo que indicaba que, tras el periodo de coexistencia de múltiples

genotipos, solo aquellos que conferían la mayor ventaja en términos de reducción del coste asociado al plásmido y aumento de su estabilidad eran los que terminaban fijándose en la población.

La aparición de múltiples variantes genéticas y la fijación de los genotipos plasmídicos más beneficiosos muestra una estrategia más que pueden seguir los plásmidos al ser adquiridos por nuevos hospedadores, y subraya una vez más la importancia de la evolución como mecanismo de adaptación y persistencia de los plásmidos en las poblaciones bacterianas.

2.3.3. Evolución del rango de hospedador de los plásmidos

Ya hemos comentado anteriormente que la adaptación y persistencia de los plásmidos está determinada por la interacción entre factores plasmídicos y factores asociados al hospedador. Desde que empezaron a utilizarse técnicas moleculares para el estudio de la biología de los plásmidos y, sobre todo, desde el desarrollo de vectores – plásmidos – como herramientas de clonaje, se observó que algunos plásmidos solo replican de forma eficiente en unas especies bacterianas concretas, mientras que otros parecen ser capaces de replicar en un amplio rango de especies e incluso familias bacterianas diferentes (Jain & Srivastava, 2013). Esto llevó a clasificar a los plásmidos en dos categorías: plásmidos de rango de hospedador reducido (NHR, *narrow host range*) y plásmidos de rango de hospedador amplio o plásmidos promiscuos (BHR, *broad host range*) (Datta & Hedges, 1972). Uno de los grupos plasmídicos más conocidos por su amplio rango de hospedador son los pertenecientes al grupo de incompatibilidad IncP-1, que incluye los plásmidos RP1, RK2, RP4, R18 o pB10 entre otros, y que son capaces de transferirse y replicar de forma estable en enterobacterias, varias especies del género *Pseudomonas*, e incluso en especies más alejadas como *Bacillus cereus* o algunas cianobacterias (Datta & Hedges, 1972; Olsen & Shipley, 1973; Krishnapillai, 1988). También pertenecen al grupo de BHR los plásmidos pertenecientes al grupo IncQ, como el plásmido RSF1010, el cual es capaz de replicarse en

varias especies bacterianas gracias a la presencia de tres genes en su origen de replicación (*repA*, *repB* y *repC*), que le permiten realizar todo el proceso de replicación plasmídica sin involucrar ninguna proteína del hospedador (Meyer, 2009).

Un estudio interesante del año 2010 determinó que puede inferirse la promiscuidad de un plásmido en base a la comparación de su composición en nucleótidos – o huella genómica – con la composición del genoma de sus hospedadores, ya que los plásmidos que hayan evolucionado durante largo tiempo en una determinada especie bacteriana (y por tanto con un rango de hospedador reducido) tendrán una composición similar a la del cromosoma, mientras que los plásmidos que replican en un rango amplio de hospedadores tendrán una huella genómica diferente a la de sus hospedadores (Suzuki *et al.*, 2010).

Algunos de los factores que pueden determinar el rango de hospedador de los plásmidos incluyen: interacciones en la superficie celular que impidan el contacto correcto entre células (necesario para la conjugación plasmídica), los sistemas de restricción específicos de cada bacteria que degradan el ADN exógeno, o la comunicación correcta entre los factores involucrados en la replicación tanto del hospedador como del plásmido (del Solar *et al.*, 1996; Jain & Srivastava, 2013). El tipo de origen de replicación plasmídico tiene un papel fundamental en el rango de hospedador. Existen plásmidos con múltiples orígenes de replicación, como pJD4 (IncW; Pagotto & Dillon, 2001) o pCU1 (IncN; Kim *et al.*, 1994), y se ha comprobado que son capaces de activarse selectivamente en función del hospedador donde se encuentren, permitiéndoles replicar en un amplio rango de hospedadores.

Al igual que ocurría con el *fitness cost* y la estabilidad plasmídica, también se han descrito modificaciones del rango de hospedador en experimentos de evolución (Maestro *et al.*, 2002; Maestro *et al.*, 2003; De Gelder *et al.*, 2008; Sota *et al.*, 2010; Loftie-Eaton *et al.*, 2016). Cuando se produce una adaptación entre un plásmido y un hospedador determinados, puede ocurrir un cambio en el rango de hospedador – la adaptación plasmídica a un hospedador determinado afecta negativamente a su estabilidad en otros hospedadores – o

una expansión del rango de hospedador – cuando el incremento de estabilidad en el nuevo hospedador no modifica dicha estabilidad en hospedadores previos.

De Gelder y colaboradores analizaron el rango de hospedador del plásmido pB10, perteneciente al grupo de incompatibilidad IncP-1, y vieron que, aun siendo capaz de replicar en las 19 cepas testadas, que incluían diferentes géneros y familias bacterianas, su estabilidad a largo plazo era muy variable en función de la cepa en que se encontrara: tras 100 generaciones, pB10 se perdió en más del 95% de la población de 3 de las cepas, mientras que en las otras 16 el plásmido se mantuvo en el 100% de la población (De Gelder *et al.*, 2007). Sin embargo, en un trabajo posterior demostraron que, tras evolucionar en presencia de presión selectiva, pB10 era capaz mantenerse de forma estable durante más de 100 generaciones en un rango más amplio de hospedadores, es decir, era capaz de expandir su rango de hospedador (De Gelder *et al.*, 2008). Tras secuenciar los plásmidos que habían ampliado este rango, observaron que todos ellos presentaban una única mutación: un cambio de aminoácido en la proteína TrbC, que participa en la unión celular durante la conjugación.

Otro ejemplo interesante es el del plásmido pPS10, un plásmido de NHR que aumenta el rango de hospedadores donde es capaz de replicar mediante mutaciones en el gen *repA*, codificante de la proteína iniciadora de la replicación plasmídica RepA (Maestro *et al.*, 2003), pero también mediante mutaciones en *dnaA*, que expresa la proteína de replicación cromosómica DnaA (Maestro *et al.*, 2002). Probablemente, en ambos casos la mejora en la interacción entre estas dos proteínas es un factor determinante en el rango de hospedador de pPS10.

No obstante, otros estudios han descrito un cambio de hospedador plasmídico tras experimentos evolutivos. En el mismo estudio mencionado anteriormente (Sota *et al.*, 2010), en el que Sota y colaboradores observaban un aumento de estabilidad de varios plásmidos IncP-1 gracias a la adquisición de mutaciones en la región N-terminal del gen *trfA*,

codificante de la proteína iniciadora de la replicación, los plásmidos evolucionados también aumentaron su estabilidad en otros cuatro hospedadores, sin embargo, no fueron capaces de replicar en *P. aeruginosa*, en la cual el plásmido ancestral sí replica (Sota *et al.*, 2010). Por tanto, en este caso la evolución compensatoria da lugar a un proceso de especialización del rango de hospedador plasmídico, en el que el plásmido es capaz de adaptarse y aumentar su estabilidad en nuevos hospedadores a cambio de sacrificar su capacidad replicativa en su antiguo hospedador.

Como conclusión, mediante experimentos evolutivos se ha demostrado que el rango de hospedador de los plásmidos puede variar e incrementarse, pasando de poder replicar en tan solo unas pocas especies bacterianas a ser capaces de mantenerse de forma estable en nuevas especies y familias bacterianas. Esto conlleva una mayor diseminación de los determinantes vehiculados por los plásmidos en las bacterias, incluyendo los genes de resistencia a antibióticos. Por tanto, es importante conocer los mecanismos moleculares responsables de la adaptación plasmídica a nuevos hospedadores para ser capaces de controlar el grave problema de la resistencia a antibióticos al que nos enfrentamos.

2.4. Los plásmidos tipo ColE1 para estudiar la adaptación plasmídica

Debido a que esta Tesis Doctoral se ha realizado con un plásmido tipo ColE1, pB1000, en este apartado voy a destacar algunos aspectos importantes de este grupo de plásmidos.

Los plásmidos tipo ColE1 (plásmidos ColE1 de aquí en adelante) son plásmidos cuya replicación está regulada por dos ARNs pequeños (del Solar *et al.*, 1998), que toman su nombre del primer plásmido descrito con este tipo de replicación, el plásmido ColE1 (Tomizawa *et al.*, 1977). Los plásmidos ColE1 son plásmidos multicopia, de pequeño tamaño, y movilizables, ya que la mayoría porta relaxasas y un origen de transferencia (Ares-Arroyo *et al.*, 2018). Atendiendo a la clasificación plasmídica en función de los genes

de movilización, quedarían englobados dentro de la familia MOB_p (Garcillan-Barcia *et al.*, 2015).

Los plásmidos ColE1 han sido descritos principalmente en dos familias bacterianas, la familia *Enterobacteriaceae* y la familia *Pasteurellaceae*, aunque más recientemente también se han encontrado en *Vibrionaceae* (Pan *et al.*, 2010) y *Aeromonadaceae* (Vincent *et al.*, 2016).

En *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae* los plásmidos ColE1 presentan una estructura similar, con dos regiones claramente diferenciadas: una región conservada y una región variable (Santos-Lopez, 2016; Ares-Arroyo *et al.*, 2018; Figuras 15 y 16).

- **Región conservada:** engloba la maquinaria necesaria para la replicación plasmídica, así como los genes de movilización y el origen de transferencia (presentes en la mayoría de los plásmidos). El contenido en GC de esta región es muy similar entre todos los plásmidos de cada una de las familias, y además es similar al del cromosoma bacteriano, lo que sugiere que estos plásmidos (o al menos el esqueleto conservado de los mismos) ha coevolucionado durante largo tiempo junto a sus hospedadores, sugiriendo un alto grado de adaptación a ellos.
- **Región variable:** en esta región la mayoría de los plásmidos ColE1 portan determinantes genéticos accesorios, como genes de resistencia a antibióticos, sistemas de restricción-modificación, o MGEs como secuencias de inserción. Al contrario de lo que ocurre con la región conservada, esta región tiene un contenido en GC mucho más variable, lo que resulta lógico al observar la diversidad de genes presentes en los ColE1 en cada una de las familias bacterianas.

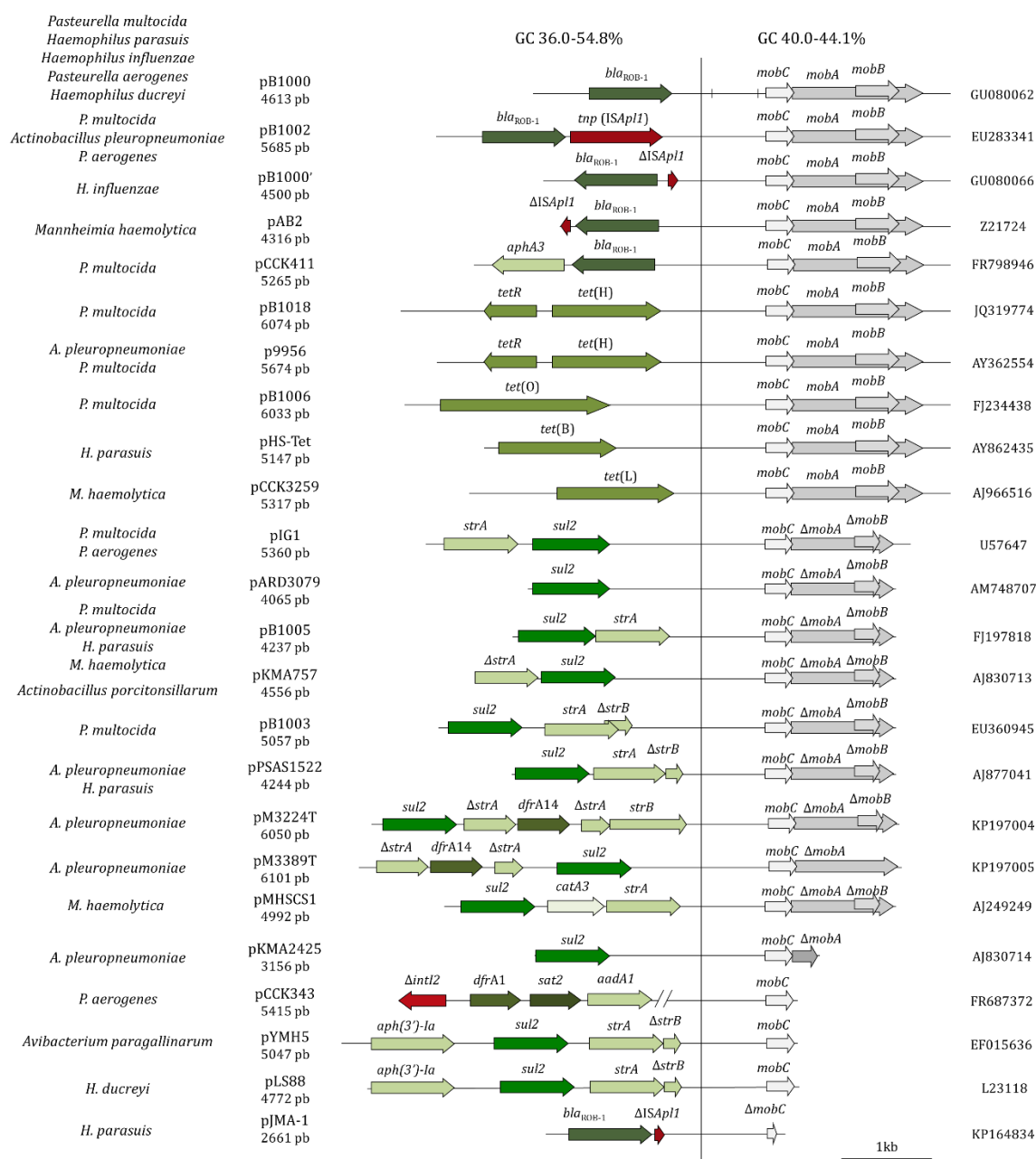


Figura 15. Estructura de los plásmidos Cole1 de la familia *Pasteurellaceae*, dividida en región conservada (derecha) y región variable (izquierda), indicando el %GC de cada una. Los genes están representados por flechas, con la punta de la flecha indicando el sentido de la transcripción. El color de los genes indica su función: gris para movilidad, verde para resistencia a antibióticos y rojo para integración. En pB1000, las dos barras verticales engloban el origen de replicación (*oriV*) y de transferencia (*oriT*) putativos. Para cada plásmido, se indican las especies en las que se ha descrito, el tamaño y el número de acceso en GenBank. Modificado de (Ares-Arroyo *et al.*, 2018).

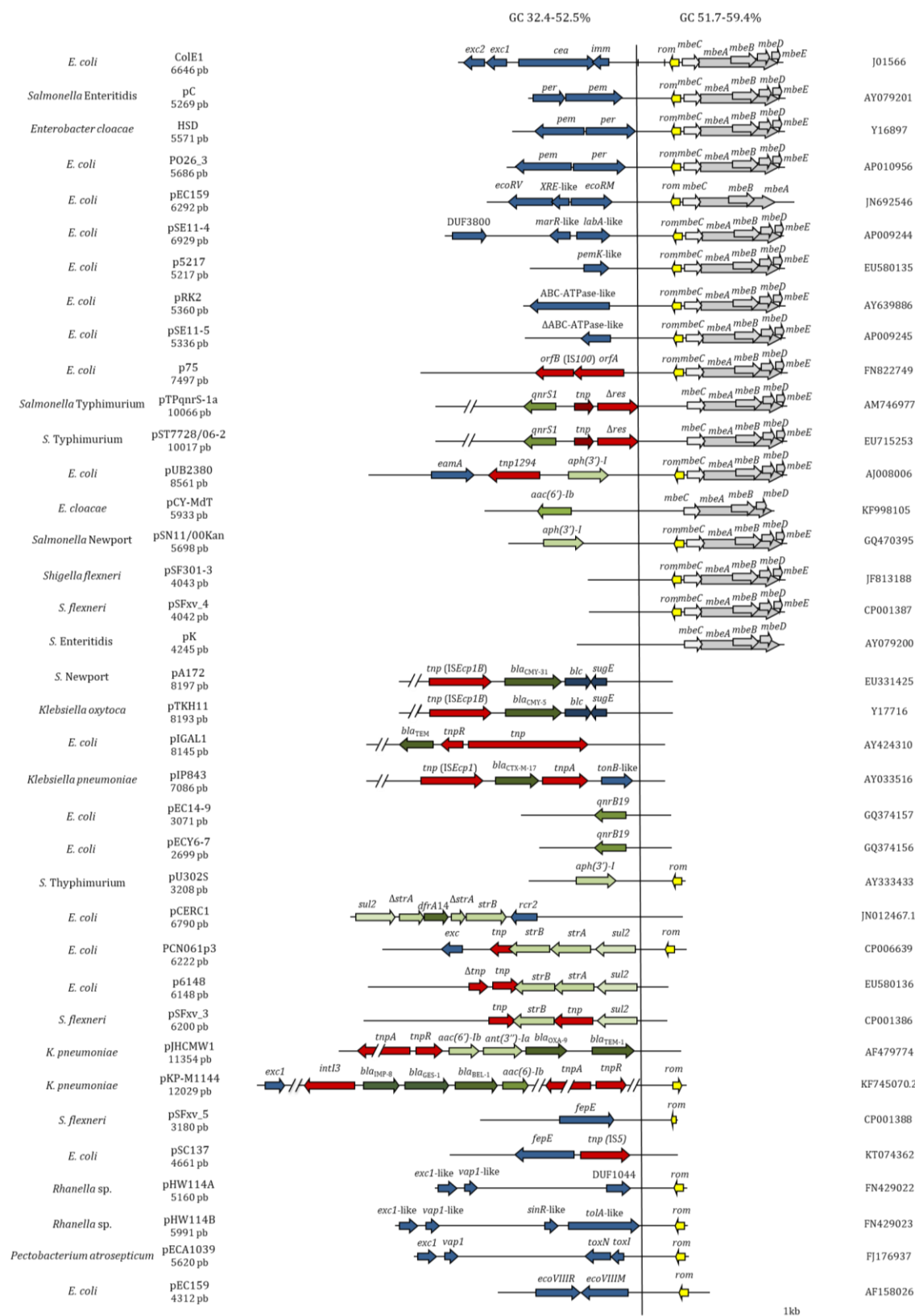


Figura 16. Estructura de 37 plásmidos Cole1 de la familia *Enterobacteriaceae*, dividida en región conservada (derecha) y región variable (izquierda), indicando el %GC de cada una. Los genes están representados por flechas, con la punta de la flecha indicando el sentido de la transcripción. El color de los genes indica su función: gris para movilidad, verde para resistencia a antibióticos, rojo para transposición o integración, amarillo para el gen *rom* implicado en la replicación, y azul para el resto de genes. En Cole1, las dos barras verticales engloban el origen de replicación (*oriV*) y de transferencia (*oriT*) putativos. Para cada plásmido, se indican las especies en las que se ha descrito, el tamaño y el número de acceso en GenBank. Modificado de (Ares-Arroyo *et al.*, 2018).

2.4.1. Relevancia en la resistencia a antibióticos

Desde las primeras descripciones de los plásmidos ColE1, estos replicones han sido ampliamente utilizados como herramienta genética con fines biológicos y biotecnológicos – ya que aportan ciertas ventajas como su pequeño tamaño o su elevado número de copias, que puede ser finamente modulado (Camps, 2010) –, y se ha dado poca importancia a su papel en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos, puesto que, al contrario que los plásmidos grandes conjugativos, no suelen codificar múltiples determinantes de resistencia. No obstante, su importancia en la diseminación de la resistencia a antibióticos probablemente ha sido subestimada, y en los últimos años varios estudios han demostrado que los plásmidos ColE1 movilizan mecanismos de resistencia de gran importancia clínica (San Millan *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2010; Ares-Arroyo *et al.*, 2018).

En la familia *Enterobacteriaceae* se han descrito ColE1 que confieren resistencia a β -lactámicos (Cao *et al.*, 2002; Papagiannitsis *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2019) – incluyendo carbapenemas (Papagiannitsis *et al.*, 2018), antibióticos de último recurso –, aminoglucósidos (de Toro *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2018a), fluoroquinolonas (Kehrenberg *et al.*, 2007; Albornoz *et al.*, 2017), sulfamidas (Handford *et al.*, 2009) y colistina (Borowiak *et al.*, 2017).

En la familia *Pasteurellaceae*, la gran mayoría de los plásmidos ColE1 descritos portan algún determinante de resistencia a antibióticos (Ares-Arroyo *et al.*, 2018), de hecho, los ColE1 han sido postulados como uno de los principales responsables de la diseminación de resistencias en esta familia bacteriana (San Millan *et al.*, 2009). Se han identificado plásmidos ColE1 en varios géneros de la familia *Pasteurellaceae*, en patógenos tanto humanos (San Millan *et al.*, 2010; Tristram *et al.*, 2010) como animales (Wood *et al.*, 1995; San Millan *et al.*, 2007; Matter *et al.*, 2008; San Millan *et al.*, 2009), confiriendo resistencia a β -lactámicos (San Millan *et al.*, 2007; Moleres *et al.*, 2015), tetraciclinas (Lancashire *et al.*, 2005; Blanco *et al.*, 2007), aminoglucósidos (Dixon *et al.*, 1994; San Millan *et al.*, 2009),

sulfamidas (Matter *et al.*, 2008; San Millan *et al.*, 2009) y trimetoprim (Bosse *et al.*, 2015). Además, se han encontrado cepas multirresistentes portadores de hasta tres replicones independientes cohabitando de manera estable en la misma célula, cada uno de ellos portador de entre uno y dos genes de resistencia distintos (San Millan *et al.*, 2009). Esta estrategia de multirresistencia se contrapone a la estrategia de portar un plásmido de gran tamaño con múltiples genes de resistencia, ampliamente descrita en otras familias bacterianas (Carattoli, 2013).

Sumado a lo anterior, los plásmidos ColE1 presentan una elevada plasticidad, y recientemente han sido descritos como plataformas de captura génica, capaces de captar y vehicular diferentes genes de resistencia a antibióticos en las bacterias (Ares-Arroyo *et al.*, 2018), por lo que, pese a su pequeño tamaño, deben ser tenidos en cuenta a la hora de buscar estrategias para frenar el avance de la resistencia a antibióticos.

2.4.2. Mecanismo de replicación de los plásmidos ColE1

Los plásmidos ColE1 son plásmidos multicopia cuya replicación está altamente regulada y cuyo número de copias por cromosoma es característico para cada plásmido (Muesing *et al.*, 1981). Los ColE1 se caracterizan por un sistema de replicación theta de clase B, en el que no existe una proteína iniciadora de la replicación, sino que está mediado por dos ARNs de pequeño tamaño (del Solar *et al.*, 1998; Lilly & Camps, 2015), cuya transcripción requiere exclusivamente proteínas y factores expresados por la célula hospedadora (Lilly & Camps, 2015). La replicación de esta superfamilia de plásmidos ha sido ampliamente estudiada, principalmente en el plásmido ColE1, prototipo de esta clase de plásmidos. Aunque la replicación de los ColE1 de la familia *Pasteurellaceae* no se han caracterizado con tanta profundidad – a excepción de (Dixon *et al.*, 1994) –, la similitud estructural de la región conservada en ambos grupos de plásmidos permite asumir que la replicación se basa en el mismo mecanismo (Santos-Lopez, 2016).

El origen de replicación de los Cole1, abreviado como *oriV*, comprende una región de unas 550 pb. La replicación comienza con la síntesis de un ARN de 550 nt, el ARNII, que se transcribe de manera constitutiva por la ARN polimerasa (ARNP) desde el promotor P2 (Camps, 2010; Figura 17).

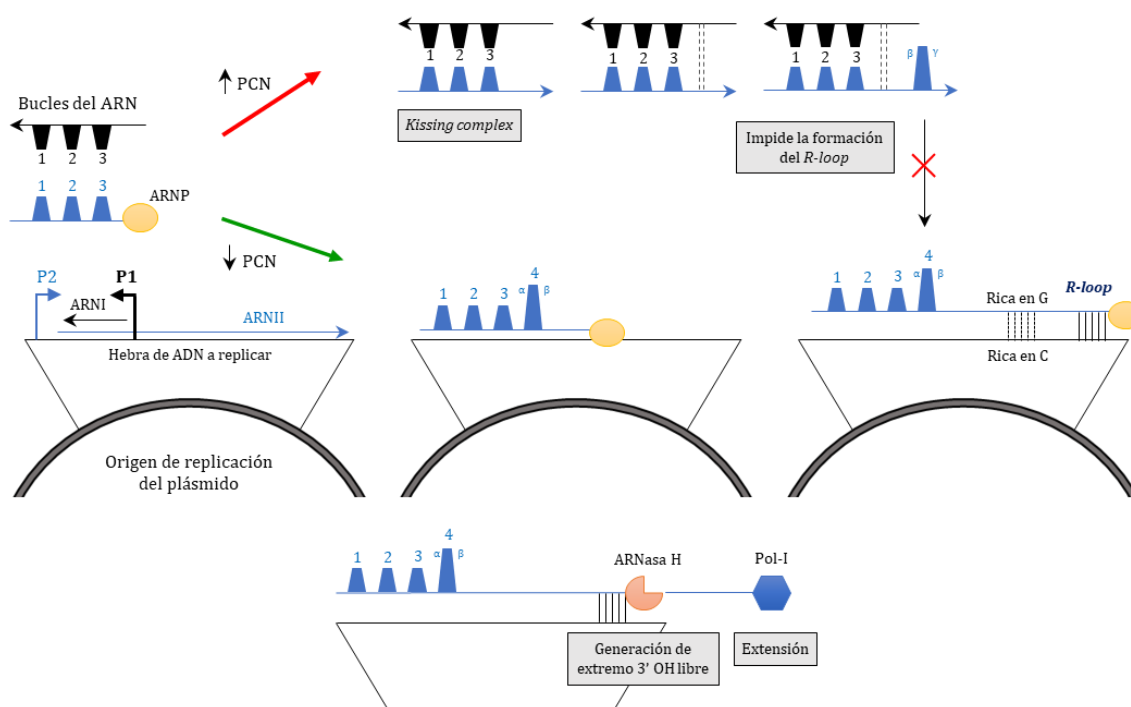


Figura 17. Regulación de la replicación de los plásmidos Cole1. En la parte de abajo se muestra la replicación del ADN plasmídico a partir de la transcripción del ARNII. En la parte de arriba se muestra la formación del *kissing complex* cuando el PCN es elevado, dando lugar a la inhibición de la replicación. Modificado de (Camps, 2010).

Durante su transcripción, el ARNII forma inicialmente 3 bucles, y finalmente da lugar a un cuarto bucle gracias a la interacción de dos segmentos complementarios, α y β . Una vez formado este cuarto bucle, el ARNII, que actúa como *pre-primer*, forma desde su extremo 3' un híbrido estable con una región de 30 nucleótidos de la hebra de ADN que va a ser replicada. La unión ADN-ARN da lugar a un bucle denominado *R-loop*. El *R-loop* es la única estructura indispensable para la correcta replicación del ADN plasmídico (Camps, 2010). La unión ADN-ARN se produce en una región rica en G del ARN, que hibrida con la zona complementaria rica en C del ADN. Una vez formado el *R-loop*, el *pre-primer* es procesado por la ARNasa H, que reconoce el motivo AAAAAA en el ARNII, creando un *primer* con extremo

3' -OH libre, desde donde comienza la extensión del ADN gracias a la ADN polimerasa I (Pol-I; Lilly & Camps, 2015). El ADN forma un nuevo bucle denominado *D-loop* que genera una señal para que se una la ADN polimerasa III, la cual completa la replicación del plásmido.

La replicación de los plásmidos ColE1 está regulada por un segundo ARN de 108 nt, el ARNI, codificado en la hebra complementaria al anterior, y que se transcribe a partir del promotor P1 (Figura 17). El ARNI actúa como inhibidor de la replicación plasmídica al unirse al extremo 5' del ARNII, regulando el número de copias del plásmido en la célula (Cesareni *et al.*, 1991). Al transcribirse, el ARNI forma también 3 bucles, que se unen a los bucles formados por el ARNII al ser complementarios, formando una unión denominada *kissing complex*. Esta unión provoca la interacción del segmento β del ARNII con otro segmento denominado γ , impidiendo la formación del cuarto bucle en el ARNII y, por tanto, inhibiendo la formación del *R-loop*, lo que finalmente bloquea la replicación del ADN plasmídico. La unión de ambos ARNs es reforzada gracias a la proteína auxiliar Rop, expresada a partir del gen *rom*, que se encuentra codificado corriente abajo del origen de replicación. La proteína Rop en forma de dímero refuerza la unión de ambos ARNs en la formación del *kissing complex*, en concreto en la unión del bucle 1 del ARNI y el bucle 3 del ARNII (Wang *et al.*, 2004). Esta proteína solo está presente en algunos plásmidos ColE1 de la familia *Enterobacteriaceae*, aunque su presencia no es necesaria. De hecho, suele ser eliminada en la mayoría de los vectores, lo que aumenta entre 3 y 5 veces el número de copias plasmídicas (Tomizawa & Som, 1984).

La cantidad de ARNI disponible en la célula está finamente regulada, ya que depende directamente del número de copias plasmídicas: el promotor P1 es mucho más fuerte que el promotor P2, dando lugar a unas 100 veces más cantidad de ARNI que de ARNII, sin embargo, la vida media del ARNI (aproximadamente 2 minutos en la fase exponencial de crecimiento) es mucho más corta que la del ARNII, lo que facilita que su síntesis y su disponibilidad se ajusten rápidamente en respuesta a las variaciones del PCN.

Además, la complementariedad y la afinidad entre los dos ARNs son esenciales para que tenga lugar una interacción correcta entre los bucles de ambos y se regule correctamente el número de copias plasmídicas (Grabherr & Bayer, 2002; Wang *et al.*, 2004; San Millan *et al.*, 2016). Se han descrito casos en los que una sola mutación en esta región altera la interacción entre ambos ARNs, ya sea incrementando la síntesis del ARNII por mutaciones en su promotor (Bert *et al.*, 2000), alterando la estructura secundaria del ARNII (Lin-Chao *et al.*, 1992), o impidiendo la síntesis correcta del ARNI (Muesing *et al.*, 1981), entre otras. De hecho, en el caso del plásmido pB1000, hemos visto cómo dos variantes del plásmido diferenciadas únicamente por un nucleótido en el *oriV* coexisten en *H. influenzae* y regulan su número de copias de manera independiente, lo que refleja una minuciosa regulación de la replicación en estos plásmidos (Santos-Lopez *et al.*, 2017a).

Por otro lado, se han descrito numerosos factores relacionados con el hospedador que pueden influenciar la replicación de los Cole1 (Wang *et al.*, 2004; Camps, 2010). Entre ellos se encuentran las proteínas implicadas en la replicación, como DnaA (inicio del proceso de replicación) la ARN polimerasa (síntesis de los ARNs), la ARNasa H (procesamiento del pre-*primer*), las ADN polimerasas I y III (síntesis de la cadena líder) o la proteína PriA (formación de la horquilla de replicación del ADN). Otro factor del hospedador que tiene especial relevancia es la interferencia con ARNts (ARNs de transferencia). Los ARNts tienen cierta homología con los dos ARNs implicados en la replicación de los Cole1 (Yavachev & Ivanov, 1988), y se ha observado que en medios carentes de aminoácidos, donde aumenta la cantidad de ARNts no cargados, éstos pueden interaccionar con el ARNI (principalmente) y con el ARNII, modificando el número de copias plasmídicas (Wang *et al.*, 2006; Wegrzyn & Wegrzyn, 2008).

2.4.3. Estabilidad de los plásmidos ColE1 en la población

Como hemos comentado anteriormente, los plásmidos poseen varios mecanismos para asegurar su presencia en ambas células hijas durante la división celular, como los sistemas de partición activa. En los plásmidos multicopia – $n > 15$ copias por bacteria (Summers, 1998) – como los ColE1, sin embargo, estos sistemas no se han encontrado (Summers *et al.*, 1993; Million-Weaver & Camps, 2014), y en caso de que existan, como ha sido especulado, es probable que los genes implicados estén codificados en los cromosomas bacterianos, debido a su pequeño tamaño y a la gran variedad de plásmidos multicopia que existe (Wang *et al.*, 2016).

Tradicionalmente se ha establecido que los plásmidos multicopia se distribuyen de manera aleatoria por el citoplasma bacteriano, modelo conocido como *random distribution model* (Durkacz & Sherratt, 1973; Summers, 1998). En el momento de la división celular, la ausencia de sistemas de partición activa es compensada con un número de copias por cromosoma elevado, de manera que la probabilidad de que una célula hija no herede ninguna copia del plásmido (P_0) tras la división celular es:

$$P_0 = 2^{(1-n)}$$

Así, para un plásmido que tenga > 15 copias por célula, se esperará que la probabilidad de que aparezca un segregante sin ninguna copia del plásmido sea menor al 0,003%.

Sin embargo, el avance en las técnicas de microscopía ha permitido observar que los plásmidos multicopia no se distribuyen al azar a lo largo de todo el citoplasma bacteriano, sino que se agrupan formando *clusters* o agregados. En 2001, Pogliano y colaboradores observaron que el plásmido multicopia RK2 formaba agregados en *E. coli* y que éstos se localizaban preferentemente en los polos y en el centro de la célula justo antes de la división bacteriana (Pogliano *et al.*, 2001). Algo similar se observó con el plásmido ColE1 en *E. coli*, donde se vio que los plásmidos formaban *clusters* en más de la mitad de las bacterias,

situados principalmente en los polos celulares, aunque su distribución variaba en función de la presencia de otros plásmidos en la célula (Yao *et al.*, 2007).

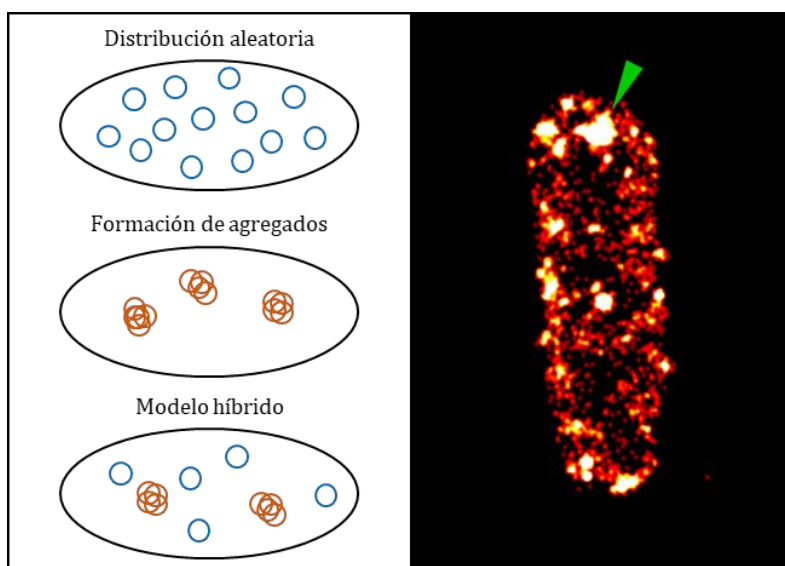


Figura 18. Distribución de los plásmidos multicopia en una bacteria. A la izquierda se indican los tres modelos propuestos, siendo el último el más aceptado. A la derecha se muestra una imagen de microscopía de fluorescencia de super resolución en la que se observa la distribución de los ColE1 por todo el espacio bacteriano y la formación de algunos agregados de plásmidos (triángulo verde). Modificado de (Wang *et al.*, 2016) y de (Wang, 2017).

Recientemente, se ha propuesto un modelo híbrido de distribución de plásmidos multicopia, en el que los plásmidos se organizan tanto formando agregados como de forma individual a lo largo de todo el espacio bacteriano. Además, con técnicas de microscopía de fluorescencia de super resolución esta distribución ha podido observarse con un plásmido tipo ColE1 en *E. coli* (Wang *et al.*, 2016; Figura 18), visualizando la formación de grandes agregados así como la distribución aleatoria del resto de plásmidos a lo largo de todo el citoplasma, excluyendo la zona donde se sitúa el ADN cromosómico. Este modelo de distribución híbrida de los plásmidos multicopia unifica las dos teorías previas, y de hecho ya había sido propuesto por otros investigadores (Summers & Sherratt, 1984; Pogliano *et al.*, 2001; Reyes-Lamothe *et al.*, 2014). Además, es consistente con la ausencia de sistemas de partición en este tipo de plásmidos, puesto que sigue existiendo un número de plásmidos libres suficiente para asegurar su presencia en ambas células hijas durante la división bacteriana.

El número de copias plasmídicas, por tanto, es un factor crítico para la estabilidad de los plásmidos ColE1 y otros plásmidos multicopia. En este sentido, la formación y resolución de dímeros y/o multímeros de plásmidos es clave para que la distribución de las copias plasmídicas durante la división celular sea adecuada. La multimerización plasmídica es un fenómeno en el que la replicación de los plásmidos a partir de su *oriV* da lugar a la formación de dímeros u oligómeros debido a procesos de recombinación homóloga. Los dímeros de plásmidos, observados por primera vez en 1984 (Summers & Sherratt, 1984), poseen dos orígenes de replicación, lo que hace que el sistema de control de la replicación detecte dos copias, cuando en realidad solo hay una copia que va a poder ser heredada. Ambos *oriV* son activos y pueden iniciar la replicación, por lo que los dímeros se replicarán a una velocidad dos veces mayor que los monómeros. Esto podría dar lugar a la rápida acumulación de dímeros plasmídicos en la célula, proceso denominado como “catástrofe de los dímeros”, e incrementaría significativamente la probabilidad de perder el plásmido durante la división celular (Summers *et al.*, 1993; Field & Summers, 2011).

Para contrarrestar el problema de la formación de dímeros y multímeros los plásmidos multicopia cuentan con sistemas de resolución de estas estructuras. Uno de los sistemas más caracterizado es el sistema Xer/*cer* del plásmido ColE1 (Summers & Sherratt, 1984; Summers & Sherratt, 1988). Este plásmido contiene un sitio *cer* de 240 pb en su secuencia, sobre el que actúan las proteínas cromosómicas XerC y XerD, junto con las proteínas accesorias ArgR y PepA, resolviendo los multímeros mediante recombinación específica de sitio. Por otro lado, el sitio *cer* también contiene un promotor, P_{cer} , desde el que se transcribe un ARN corto denominado Rcd, el cual tan solo se produce en los dímeros. Rcd interaccionada con una enzima triptofanasa, aumentando la producción de indol en la célula, lo que detiene el crecimiento y la división celular (Chant & Summers, 2007; Chimere *et al.*, 2012), e interacciona con una ADN girasa, que produce la inhibición de la replicación plasmídica (Field & Summers, 2012). Esta interrupción de la replicación y del crecimiento bacteriano permite que haya tiempo suficiente para que los multímeros se resuelvan por

recombinación y aumente el número de monómeros antes de la división celular, para así minimizar la aparición de células libres de plásmidos. Ambas partes del sistema Xer/*cer* son necesarias, pues se ha visto que plásmidos con la secuencia *cer* son inestables en células que no producen indol (Chant & Summers, 2007).

Como hemos visto, los plásmidos multicopia, aun careciendo de sistemas de partición activa como los que se encuentran en los plásmidos conjugativos, han desarrollado otras estrategias para mantenerse en las poblaciones bacterianas. Sin embargo, su presencia en la célula también puede estar asociada a un coste metabólico. Varios trabajos han cuantificado el coste biológico asociado a plásmidos ColE1 (San Millan *et al.*, 2010; Moleres *et al.*, 2015; San Millan *et al.*, 2015a; Santos-Lopez *et al.*, 2017a; Santos-Lopez *et al.*, 2017b). Estos costes pueden estar producidos por distintos mecanismos, como hemos descrito en el apartado 2.3.1. Por tanto, el hecho de tener un número de copias elevado no asegura su permanencia en una población bacteriana en ausencia de presión selectiva, principalmente cuando son adquiridos por nuevos hospedadores. Numerosos estudios reflejan que la coevolución entre plásmido y hospedador puede disminuir el coste biológico de estos determinantes y aumentar su persistencia en las poblaciones bacterianas, no obstante, salvo algunas excepciones (San Millan *et al.*, 2015a; Santos-Lopez *et al.*, 2017b), la mayoría de los plásmidos investigados son plásmidos grandes conjugativos o construcciones plasmídicas derivadas de plásmidos naturales (Tabla 1). Por ello, son necesarios más estudios que ayuden a esclarecer los mecanismos involucrados en la adaptación de los plásmidos pequeños a nuevos hospedadores.

2.4.4. El plásmido pB1000 como modelo de los ColE1 en *Pasteurellaceae*

En este último apartado de la introducción vamos a describir el plásmido pB1000, ya que se trata del plásmido utilizado como modelo a lo largo de esta Tesis Doctoral. pB1000 es un

plásmido tipo ColE1, pequeño y multicopia, que se ha encontrado en varias especies de la familia *Pasteurellaceae* (Figura 15). Fue descrito por primera vez en el año 2007 en *Haemophilus parasuis* (San Millan *et al.*, 2007), y desde entonces ha sido descrito en otras especies patógenas, entre las que se encuentran *P. multocida* (San Millan *et al.*, 2009), *H. ducreyi* (Gangaiah *et al.*, 2016) o *H. influenzae* (San Millan *et al.*, 2010; Tristram *et al.*, 2010). Esta última, *H. influenzae*, es probablemente la especie más relevante, puesto que puede producir meningitis y neumonía en los seres humanos (Shapiro & Ward, 1991). Además de la diversidad de especies de esta familia en las que ha sido aislado, pB1000 ha sido descrito en tres continentes diferentes, América del Norte, Europa y Australia (Tristram *et al.*, 2010; San Millan *et al.*, 2011), lo que evidencia la distribución mundial de este plásmido.

El plásmido pB1000 codifica la β -lactamasa ROB-1, la cual es la segunda β -lactamasa más prevalente en la familia *Pasteurellaceae*, siendo la más frecuente TEM-1 (Farrell *et al.*, 2005). Mientras que TEM-1 ha sido descrita también en otras familias bacterianas (Shaikh *et al.*, 2015), ROB-1 parece estar adaptada exclusivamente a la familia *Pasteurellaceae*, puesto que no se ha encontrado en ninguna otra familia bacteriana. ROB-1, expresado a partir del gen *bla*_{ROB-1} codificado en pB1000, es una β -lactamasa de clase A que confiere fenotipo de resistencia a penicilinas y cefaclor (Karlowsky *et al.*, 2000). En *H. influenzae*, pB1000 confiere una resistencia a ampicilina de 512 mg/l (San Millan *et al.*, 2015a).

El comportamiento biológico de pB1000 ha sido caracterizado en profundidad en uno de sus hospedadores naturales, *H. influenzae*. Mediante ensayos de competición se ha comprobado que pB1000 reduce entre un 5,67% y un 9% el *fitness* bacteriano (San Millan *et al.*, 2010; San Millan *et al.*, 2015a). No obstante, pese al coste biológico impuesto, pB1000 es estable durante al menos 300 generaciones en ausencia de presión antibiótica (Santos-Lopez *et al.*, 2017a), con un 100% de las colonias testadas positivas a la presencia del plásmido. También ha mostrado ser estable en *P. multocida*, donde el 100% de la población mantiene el plásmido durante al menos 60 generaciones (San Millan *et al.*, 2009). Esto

muestra el elevado grado de adaptación de pB1000 a sus hospedadores naturales, pues, pese al *fitness cost* que produce, el plásmido es mantenido en la población en ausencia de presión selectiva. El PCN de pB1000 en *H. influenzae* también ha sido caracterizado, presentando un número medio de copias de 44,5 por cromosoma (San Millan *et al.*, 2015a).

Como hemos mencionado, ambos factores (coste biológico y número de copias) están muy relacionados con la estabilidad de los plásmidos multicopia en las poblaciones bacterianas. Al evolucionar pB1000 en *H. influenzae*, hemos visto que, en ausencia de presión antibiótica, se compensa totalmente el coste biológico asociado al plásmido y, además, el PCN se reduce significativamente. Por otro lado, al evolucionar en presencia de ampicilina, el PCN aumenta hasta valores de 100 copias por bacteria, incrementando también el nivel de resistencia a ampicilina de las bacterias portadoras (San Millan *et al.*, 2015a). Estos resultados sugieren que, al coevolucionar con su hospedador en un ambiente concreto, pB1000 es capaz de ajustar su PCN para reducir al máximo el *fitness cost* impuesto sin comprometer su estabilidad en la población.

Por último, la capacidad de movilización de pB1000 también ha sido estudiada. pB1000 es capaz de replicar en *E. coli*, donde puede ser adquirido mediante conjugación empleando la maquinaria conjugativa de un plásmido IncP y donde ROB-1 es capaz de expresarse y conferir fenotipo de resistencia (Galan *et al.*, 2003; San Millan *et al.*, 2009). Sin embargo, al contrario que en sus hospedadores naturales, pB1000 es altamente inestable en *E. coli*, y en tan solo 3 días ninguna bacteria mantiene el plásmido. Por tanto, pB1000 es un plásmido con un rango de hospedador reducido, adaptado únicamente a la familia *Pasteurellaceae*, y que muestra una alta inestabilidad en otras especies bacterianas.



JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La resistencia a antibióticos constituye hoy en día un grave problema sanitario y ambiental, que amenaza con destruir el sistema de Salud Pública del que disponemos y que augura un retorno a la época pre-antibiótica si no conseguimos ponerle freno. El uso excesivo e incorrecto que hemos hecho de los antibióticos es una de las principales causas del aumento de las bacterias resistentes en las últimas décadas, y esto se ve agravado por la transferencia horizontal de genes, que permite a las bacterias adquirir nuevos mecanismos de resistencia de manera horizontal.

Los plásmidos son uno de los principales vectores en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos, así como los elementos móviles más ampliamente distribuidos entre las bacterias. Sin embargo, en ambientes en los que no existe una selección sobre los determinantes codificados en los plásmidos, éstos pueden suponer un coste innecesario para la bacteria portadora, lo que finalmente puede llevar a la pérdida del plásmido en la población.

Numerosos trabajos han documentado la capacidad de adaptación y persistencia de los plásmidos en las bacterias mediante experimentos de evolución compensatoria. La coevolución entre plásmido y hospedador en muchos casos da lugar a fenómenos adaptativos por parte del plásmido, el cromosoma, o ambos, que permiten reducir el coste asociado a los replicones y aumentan su estabilidad en la población. Sin embargo, en muchos de estos estudios no se llegan a conocer con claridad los mecanismos responsables de dicha adaptación. También resulta destacable que la mayoría de estos trabajos se ha realizado con plásmidos grandes conjugativos, que portan la maquinaria necesaria para su propia transferencia a nuevos hospedadores, y muchas de las estrategias que llevan a la adaptación entre plásmido y bacteria no pueden aplicarse a los plásmidos no conjugativos.

Los plásmidos ColE1 son plásmidos pequeños, movilizables y multicopia, ampliamente distribuidos en las familias *Enterobacteriaceae* y *Pasteurellaceae*, y su implicación en la diseminación de genes de resistencia a antibióticos ha sido documentada en numerosas

publicaciones, siendo el principal vehículo de diseminación de resistencias en la familia *Pasteurellaceae*. Los resultados de trabajos previos sugieren que los ColE1 de esta familia están altamente adaptados a su hospedador y, pese a ser capaces de replicar en otras familias bacterianas, son inestables y se pierden en pocas generaciones.

Por ello, el principal objetivo de esta Tesis Doctoral es estudiar la capacidad de adaptación de los plásmidos ColE1 de *Pasteurellaceae* a otras familias bacterianas, tomando como modelo al plásmido pB1000, el cual es el plásmido ColE1 más descrito y mejor caracterizado de esta familia, y a la enterobacteria *E. coli*. Mediante ensayos de evolución compensatoria, evaluaremos la adaptación del replicón a esta especie bacteriana, y analizaremos en profundidad todos los mecanismos moleculares, tanto plasmídicos como cromosómicos, que pueden estar involucrados en la adaptación entre plásmido y bacteria.

Los resultados de este estudio aportarán nueva luz sobre la capacidad de adaptación de los plásmidos multicopia cuando son adquiridos por nuevas especies, y ayudarán a entender el éxito y la prevalencia de estos determinantes en la naturaleza.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las bacterias utilizadas en este trabajo pueden encontrarse en la Tabla 2. *P. multocida* BB1034, de la que se obtuvo el plásmido pB1000, se cultivó en placas de agar Columbia con 5% de sangre de oveja (bioMérieux, Francia). *H. influenzae* RdKW20 se cultivó en placas de agar chocolate PolyViteX (bioMérieux, Francia) y en medio HTM (*Haemophilus Test Medium*) (Francisco Soria Melguizo, S.A., España) en condiciones de microaerofilia (5% CO₂). Las cepas de *E. coli* DH5 α se cultivaron en medio BHI (*Brain Heart Infusion*) (bioMérieux, Francia) con o sin agar (Laboratorios Conda S.A., España), y las de *E. coli* MG1655 en medio LB (*Luria Bertani*) (Laboratorios Conda S.A., España), con o sin agar. Todas las bacterias se incubaron a 37°C y, cuando se requirió agitación, ésta se realizó a 100-150 rpm. Salvo especificación contraria, tanto los cultivos en medio líquido como los cultivos en placa se incubaron 16 horas, equivalente a un O.N. (*overnight*).

2. Antibióticos empleados y test de susceptibilidad

Todos los antibióticos empleados en este trabajo fueron provistos por Sigma (Sigma-Aldrich, Estados Unidos). El nivel de resistencia a ampicilina de las cepas de *E. coli* portadoras de los plásmidos se evaluó midiendo la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante el método de microdilución en placa en medio líquido Mueller-Hinton (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), siguiendo los estándares marcados por el CLSI (2018). La CMI de cada cepa se analizó en al menos tres réplicas independientes, y los valores finales reflejan la media de todas las mediciones de cada cepa.

3. Plásmidos y construcciones plasmídicas realizadas

Todos los plásmidos y construcciones plasmídicas utilizadas en este trabajo pueden encontrarse en la Tabla 3. Todas las construcciones plasmídicas realizadas a partir de

pB1000 y pBAD43 se realizaron con los kits In-Fusion® HD Cloning Kit (TaKaRa, Japón) o con Gibson Assembly® Cloning Kit (New England Biolabs, Estados Unidos). Todos los oligonucleótidos diseñados, así como las condiciones de las reacciones para los clonajes, se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones de ambos fabricantes.

Para la obtención de las construcciones *mock* se amplificaron fragmentos de ADN de una región interna del gen codificante del ARN ribosomal 16S de *E. coli* DH5α mediante PCR, y dichos fragmentos fueron clonados en pB1000 con los kits indicados previamente.

El plásmido pBAD43 se empleó para analizar la expresión de los ORFs de pB1000. Este vector contiene el origen de replicación del plásmido pSC101 (número de acceso en GenBank: X01654), por lo que tiene bajo número de copias, y contiene el promotor del operón *araBAD* y el gen regulador de dicho operón *araC*, lo que permite la regulación de la expresión de los genes clonados a continuación del operón mediante la adición al medio de arabinosa al 0,2% – inductor – o glucosa al 1% – represor.

4. Oligonucleótidos, PCRs y secuenciación de ADN

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron provistos por Sigma (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y pueden encontrarse en la Tabla 4. Todas las PCRs se realizaron con reactivos de Biotools (Biotools B&M Labs S.A., España) y las enzimas Taq polimerasa (Biotools B&M Labs S.A., España) o Phusion polimerasa (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), con sus correspondientes *buffers*, o bien con el DNA AmpliTools Green Master Mix (Biotools B&M Labs S.A., España).

La purificación de productos de PCR se realizó con el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN, INC., Alemania) y, en caso de extracción de gel, con el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN, INC., Alemania). La secuenciación por el método Sanger de los fragmentos de ADN de interés se realizó en Secugen (Secugen S.L., España) y en MacroGen (MacroGen, Inc., Corea

del Sur). En los casos en los que se analizó la frecuencia relativa entre dos variantes nucleotídicas en la misma posición, se empleó el software QSVanalyser (Carr *et al.*, 2009) a partir de los cromatogramas obtenidos de la secuenciación.

En los casos en los que se secuenció el genoma completo, la secuenciación se realizó combinando dos técnicas: (i) la plataforma MiSeq de Illumina (Illumina, Inc., Estados Unidos), con un *coverage* de 150X, realizada en colaboración con la Universidad de Copenhague, y (ii) la tecnología Nanopore (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), empleando un dispositivo MinION. Para la secuenciación por Nanopore, se extrajo el ADN con el kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Estados Unidos), siguiendo las indicaciones del fabricante, y se secuenció con MinION usando el protocolo 1D Native Barcoding Genomic DNA. Los *reads* de Illumina se procesaron con el programa Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), y los de Nanopore con los programas MinKNOW (Oxford Nanopore Technologies, Reino Unido), Epi2Me (Metrichor, Oxford, Reino Unido) y Porechop. Finalmente, se empleó el programa Unicycler (Wick *et al.*, 2017) para realizar el ensamblado híbrido con los *reads* obtenidos por ambas técnicas, y los ensamblados se analizaron con el programa Geneious 8.1.9 (Kearse *et al.*, 2012).

5. Condiciones de transformación y electroporación de los plásmidos

Todas las construcciones plásmido/bacteria de este trabajo se obtuvieron mediante transformación bacteriana. Las células electrocompetentes de *E. coli* y *H. influenzae* se prepararon siguiendo los protocolos previamente publicados (Mitchell *et al.*, 1991; Gonzales *et al.*, 2013). Todos los plásmidos se transformaron en las bacterias electrocompetentes usando los electroporadores Gene Pulser (Bio-Rad, Estados Unidos) y Eporator (Eppendorf, Alemania). Las condiciones de electroporación en todos los casos fueron las siguientes: 2,5 kV/cm, 25 μ F y 200 Ω .

Tabla 2. Bacterias utilizadas en este trabajo. Para cada cepa bacteriana, se indican los plásmidos que portan, el nombre abreviado, los genes de resistencia portados por el plásmido, y la referencia o número de acceso en GenBank (2019).

Cepa	Nombre abreviado	Plásmido	Antibiótico de selección	Referencia o Número de acceso
<i>Pasteurella multocida</i> BB1034	<i>P. multocida</i>	pB1000, pB1001	Ampicilina, tetraciclina	(San Millan <i>et al.</i> , 2009)
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α	Ninguno	Ninguno	NZ_JRYM00000000
	Ec-pB1000	pB1000	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-IS1	pB1000::IS1	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-IS10	pB1000::IS10	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-SNP	pB1000.SNP	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-SNP/IS1	pB1000.SNP::IS1	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-SNP/IS10	pB1000.SNP::IS10	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-mock1	pB1000::mock1	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-mock10	pB1000::mock10	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-2310A	pB1000.2310A	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-IS10'	pB1000::IS10'	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-mock1'	pB1000::mock1'	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-mock10'	pB1000::mock10'	Ampicilina	Este trabajo
	Ec-FT+	pFT+	Ampicilina	Nuestro laboratorio
<i>Haemophilus influenzae</i> RdKW20	<i>H. influenzae</i>	Ninguno	Ninguno	NC_000907
	Hi-pB1000	pB1000	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-IS1	pB1000::IS1	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-IS10	pB1000::IS10	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-SNP	pB1000.SNP	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-SNP/IS1	pB1000.SNP::IS1	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-SNP/IS10	pB1000.SNP::IS10	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-mock1	pB1000::mock1	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-mock10	pB1000::mock10	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-2310A	pB1000.2310A	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-mock1'	pB1000::mock1'	Ampicilina	Este trabajo
	Hi-mock10'	pB1000::mock10'	Ampicilina	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	<i>E. coli</i> MG1655	Ninguno	Ninguno	NC_000913.3
	Ec-pBAD	pBAD43	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-pBAD3	pBAD-3	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-pBAD40	pBAD-40	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V1	V1GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.1	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.1t	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.2	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.2t	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.3	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-V4.3t	V4GTC	Espectinomicina	Este trabajo
	Ec-pBAD40FT	pBAD-40FT	Espectinomicina	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo. Se indican el nombre abreviado del plásmido y la descripción de sus características. Las referencias o números de acceso en GenBank (2019) de los plásmidos originales se indican en su descripción; el resto pertenecen a este trabajo.

Plásmido	Descripción
pB1000	Plásmido WT. Número de acceso en GenBank: GU080062
pB1000::IS1	pB1000 con inserción de <i>IS1</i> , aislado durante las evoluciones
pB1000::IS10	pB1000 con inserción de <i>IS10</i> , aislado durante las evoluciones
pB1000.SNP	pB1000 con mutación T3874A, aislado durante las evoluciones
pB1000.SNP::IS1	pB1000 con mutación T3874A e inserción de <i>IS1</i> , aislado durante las evoluciones
pB1000.SNP::IS10	pB1000 con mutación T3874A e inserción de <i>IS10</i> , aislado durante las evoluciones
pB1000::mock1	pB1000 con inserción de fragmento <i>mock1</i> , del mismo tamaño y en la misma posición que <i>IS1</i>
pB1000::mock10	pB1000 con inserción de fragmento <i>mock10</i> , del mismo tamaño y en la misma posición que <i>IS10</i>
pB1000.2310A	pB1000 con adición de una adenina en la posición 2310 del plásmido
pB1000::IS10'	pB1000::IS10 en el que la diana de HincII GTCAAC es sustituida por GTCTAC
pB1000::mock1'	pB1000::mock1 en el que la diana de HincII GTCGAC es sustituida por GTAGAC
pB1000::mock10'	pB1000::mock10 en el que las dos dianas de HincII GTCGAC han sido sustituidas por GTAGAC
pBAD43	Vector de expresión (Guzman <i>et al.</i> , 1995)
pBAD-3	pBAD43 en el que se ha clonado el ORF3 de pB1000 a continuación del promotor <i>araBAD</i>
pBAD-40	pBAD43 en el que se ha clonado el ORF40 de pB1000 a continuación del promotor <i>araBAD</i>
V1GTC	pBAD-40 con mutación G → C en el primer codón del ORF40
V4GTC	pBAD-40 con mutación G → C en el cuarto codón del ORF40
pBAD-40FT	pBAD-40 en el que se ha fusionado la etiqueta 3xFlagTag al ORF40
pFT+	Vector C7472-CMV-7-BAP, que expresa la etiqueta 3xFlagTag unida a una proteína de 1,3 kb, usado como C+ en los WB (Sigma-Aldrich, Estados Unidos)

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo. Se indican el experimento para el que se emplearon, su nombre y su secuencia. Salvo especificación de la referencia bajo su nombre, todos los oligonucleótidos fueron diseñados para este trabajo.

Experimento	Nombre	Secuencia
pB1000	Amplificación región de ISs	pB1000.IS F pB1000.IS R pB1000 ori F (Santos-Lopez <i>et al.</i> , 2017a) pB1000 ori R (Santos-Lopez <i>et al.</i> , 2017a)
	Amplificación <i>oriV</i>	AAGGTCATACAATGGGAAAGG GTGTGGCTGATTGTCACAG AATTGGTTGGACAATAACGCA AATCTCGCTTATCAGGTGTGC
	Amplificación <i>bla_{ROB-1}</i>	rob1 R GAAGTCCGAGCTGAAGACCGT
	Amplificación plásmido completo	pB1000.A F pB1000.A R pB1000.B F pB1000.C F pB1000.C R pB1000.D R pB1000.E F pB1000.E R
		TGTTTCGAGCTGAACCGCATAG GCTCTCTAATTCTTTCGATAA CGACCCCTAATCGCCTTGACGA AGTGTTAGCAAGATGATCAGA TTATCGTACACTTTCCA AAATCAGCGGAGCCGATAGGC TTAATACGAAAATTAAGCTCT GCCCTGCAGGATTGGGCGGT
	PCR cuantitativa	rob1 qPCR F (Santos-Lopez <i>et al.</i> , 2017a) rob1 qPCR R (Santos-Lopez <i>et al.</i> , 2017a) uidA qPCR F uidA qPCR F
		CCAATTCTGTTTCAATTCGGTAAC CATAAGCAAAGCGTTTCATCTG GTCAATAATCAGGAAGTG AAAGAAATCATGGAAGTAA
	Construcción variantes <i>mock</i>	mock1.I F mock1.I R mock1.V F mock1.V R mock10.I F mock10.I R mock10.V F mock10.V R
		TCAAGCATAGCTAGTCAAGTCAACGGTAACAGGAA GGTAAGTACAAAAGTACCTCCAAGTCGACATCGTTT CTAGTACTTTTGTACTTACCG CTATGCTTGATGTACTTATCATC TCAAGCATAGCTAGTAAACGTCGCAAGACCAAGAG GGTAAGTACAAAAGTCCCTACGGTTACCTTGTT AGTACTTTTGTACTTACCGCCAC AGCTATGCTTGATGTACTTATCATCG

Experimento	Nombre	Secuencia
pB1000	Construcción variante 2310A	2314A F 2314A R GTACATCAAAGCATAGCTAGTACT TATGCTTTGATGTACTTATCATCG
	Mutar diana HincII en IS10 y mocks	IS10' F IS10' R GACCAGTCTACAAGTACAATGGG GTACTTGTAGACTGGTCTGATATTCG AACGATGTAGACTTGGAGGTCTAGTAC CCAAGTCTACATCGTTTACGGCGT AACGATGTAGACTTGGAGGTTGTG CGTTAAGTAGACCGCTGGGGAG GGCGGTCTACTTAACGCGTTAGC
pBAD43	Amplificación región de ORFs	pBAD F pBAD R AGATTAGCGGATCCTACCTG TTAATCTGTATCAGGCTGAA
	Amplificación promotor <i>araBAD</i>	pBAD-ara F AGATGGGCATTAAACGAGTATCC
	Construcción variantes ORFs	pBAD-3I F pBAD-3I R pBAD-3V F pBAD-3V R pBAD-40I F pBAD-40I R pBAD-40V F pBAD-40V R GAATTCACCATGATAAGTACATCAAGCATAGC CCGGGTACTTATTATGTGAAACATCAGAAATT TTCACATAATAAGTACCGGGGATCCTCTAGAG ACTTATCATGGTGAATTCCTCTGCTAGC GAATTCACCGTGATTTATGTGAAACATCAG CCGGGTACTTATTAGGCTAATTTATTTAAACGATG TTAGCCTAATAAGTACCGGGGATCCTCTAGAGTC ATAAATCACGGTGAATTCCTCTGCTAGCC
	Mutación de valinas en pBAD-40	V1GTC F V1GTC R V4GTC F V4GTC R TTCACCGTCATTTATGTGAAAACATC CATAAATGACGGTGAATTCCTCTGCTG ATTTATGTCAAAACATCAGAAATTATT ATGTTTTGACATAAATCACGGTGAA
	Construcciones para Western Blots	FT pBAD40 F FT pBAD40 R pBAD40 FT F pBAD40 FT R TTAAATAAATTAGCGGACTACAAAGCCATGACGGTG CCGGGTACTTATTACTTGTCTATCCTCTGTAGTC TAATAAGTACCGGGGATCC GGCTAATTTATTTAAACGATGATAAG
	Construcción triple ORF40	ORF40x3.V F ORF40x3.V R ORF40x3.I1 F ORF40x3.I1 R ORF40x3.I2 F ORF40x3.I2 R CAAACTCTTTTGTATTATTTTCTAAATAC TAGAAACGCAAAAGGCCATCCG ATGGCCTTTTTCGCTTTCTACCATTGAGAGAAGAAACCAATTGTC CTCTGAATGGTAGAAACGCAAAAGGCCATCCG TGCGTTTCTACCATTGAGAGAAGAAACCAATTGTC AAAATAAACAAAGAGTTTGTAGAAACGCAAAAGGCCATCCG
Amplificación <i>dnaK</i>	dnaK F	CTCACAACCACATGATGACCG
	dnaK R	GCGGAGAGGAAATTCCTCTT

6. Ensayos de evolución

Se realizaron nueve evoluciones experimentales independientes de *E. coli* DH5α con pB1000 (Figura 19). Para cada una de ellas, 10⁶ UFCs de bacterias portadoras del plásmido se inocularon en 5 ml de BHI, añadiendo 50 mg/l de ampicilina para forzar el mantenimiento del plásmido en la población. Los cultivos se incubaron a 37°C y 100 rpm durante 50 días, que se corresponden con 500 generaciones aproximadamente, y se realizó una dilución 1:1000 diariamente, transfiriendo 5 µl del cultivo en 5 ml de medio nuevo (lo que representa unas 10 generaciones por día). En seis de las nueve evoluciones experimentales, cada 5 días (correspondientes a 50 generaciones aproximadamente) las bacterias se sembraron en placas de BHI-agar con ampicilina y se extrajeron los plásmidos

de cada población usando el Kit QIAprep® Spin Miniprep (QIAGEN, INC., Alemania). Adicionalmente, en tres de las evoluciones experimentales los plásmidos también se extrajeron cada 24 horas durante los 5 primeros días de las evoluciones.

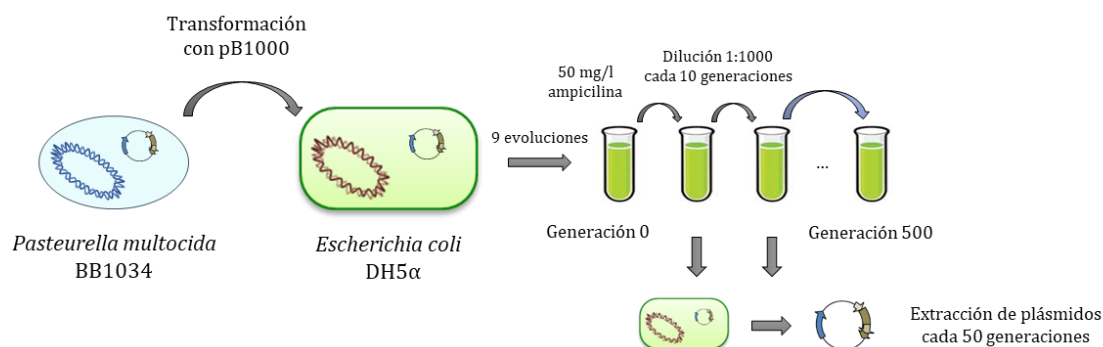


Figura 19. Representación de las evoluciones experimentales de pB1000 en *E. coli* DH5α.

7. Ensayos de estabilidad

La estabilidad de los plásmidos en sus hospedadores se analizó mediante dos métodos. En el caso de pBAD43 y sus variantes, la estabilidad se analizó calculando el porcentaje de bacterias portadoras de plásmido a lo largo de 80 generaciones en ausencia de presión antibiótica. Para ello, se inocularon aproximadamente 10^6 UFCs de bacterias portadoras de plásmido en 5 ml de LB y se incubaron durante 80 generaciones en agitación. Cada 24 horas (10 generaciones aproximadamente), 5 µl del cultivo se transfirieron a 5 ml de medio nuevo, y se sembraron las bacterias en placas de LB-agar sin antibiótico. El porcentaje de bacterias resistentes en cada momento se calculó replicando entre 100 y 150 colonias en placas con espectinomicina, resistencia conferida por el gen *aad(9)* que portan pBAD43 y sus variantes. Los resultados reflejan la media de al menos tres mediciones independientes.

En el caso de pB1000 y sus variantes, la estabilidad se analizó calculando el porcentaje de mantenimiento de cada plásmido. Esto se debió a que el plásmido pB1000 es altamente inestable en *E. coli*, lo que provocó que al comienzo de los ensayos de estabilidad ya hubiera bacterias que no portaban ninguna copia del plásmido incluso seleccionando colonias obtenidas de placas con presión antibiótica. El cálculo del porcentaje de mantenimiento

permite valorar la estabilidad o mantenimiento del plásmido en relación a las bacterias portadoras de plásmido en el momento de iniciar el experimento, por lo que fue más adecuado en este caso. El ensayo de estabilidad se realizó de manera similar al anterior: se inocularon 10^6 UFCs de bacterias con plásmido en 5ml de BHI, y se incubaron durante 100 generaciones en agitación. Cada 24 horas se realizó una dilución 1:1000, y se sembraron las bacterias en placas de BHI-agar sin antibiótico. Se calculó el porcentaje de bacterias resistentes en cada momento replicando entre 100 y 150 colonias en placas con ampicilina, resistencia conferida por el gen *bla*_{ROB-1} que portan pB1000 y sus variantes. El ratio (R) entre bacterias resistentes y sensibles en cada momento, dividido por el mismo ratio a tiempo 0 (al comienzo del ensayo), nos dio el mantenimiento del plásmido en dicho momento. El coeficiente de selección (s), que refleja la pérdida del plásmido en la población en relación a su valor inicial, se calculó como la pendiente del modelo de regresión $s = \ln(R)/t$, donde (t) indica las generaciones bacterianas y se calculó como el \log_2 del factor de dilución (que en nuestro caso fue 1:1000). Finalmente, el porcentaje de mantenimiento de cada plásmido se obtuvo con la fórmula $(1-s) \times 100$, que refleja el mantenimiento del plásmido en relación a la población inicial portadora del replicón. Los resultados reflejan la media de al menos tres mediciones independientes.

8. Medición del coste biológico

El coste biológico de pB1000 y sus variantes se analizó mediante ensayos de competición directa entre *E. coli* portadora de plásmido y *E. coli* libre de plásmido, adaptando el método descrito por San Millan y colaboradores (San Millan *et al.*, 2015a). Debido a la alta inestabilidad de algunas de nuestras variantes plasmídicas, los ensayos de competición se realizaron durante 48 horas en vez de los seis días descritos en la bibliografía, para minimizar el efecto de la pérdida por segregación de los plásmidos en la población. Para realizar los ensayos de competición, aproximadamente 10^6 UFCs de cada cepa (*E. coli* con y sin plásmido) se inocularon en 5 ml de BHI, mezclando ambas poblaciones. Dicho inóculo

se incubó a 37°C en agitación durante 48 horas (20 generaciones aproximadamente), realizando una dilución 1:1000 a las 24 horas. Las bacterias se sembraron en placas de BHI-agar sin antibiótico en las generaciones 0, 10 y 20, y 100-150 colonias en cada momento se replicaron en placas de BHI-agar con ampicilina. El coste biológico asociado a cada plásmido se calculó obteniendo el *fitness* relativo bacteriano, que refleja la diferencia de *fitness* entre las bacterias portadoras de plásmido y las bacterias libres de plásmido. Este valor se obtuvo de manera similar al ratio de mantenimiento del plásmido en los ensayos de estabilidad: se calculó el ratio (R) entre bacterias resistentes y sensibles en 10 y 20 generaciones, dividido por el mismo ratio a tiempo 0 (al comienzo del ensayo). El coeficiente de selección (s), que refleja la pérdida del plásmido tras 10 y 20 generaciones en relación a su valor inicial, se calculó como la pendiente del modelo de regresión $s = \ln(R)/t$, donde (t) indica las generaciones bacterianas y se calculó como el \log_2 del factor de dilución (que en nuestro caso fue 1:1000). Finalmente, el *fitness* relativo de cada cepa se calculó con la fórmula $1 + s$, y el porcentaje de coste biológico asociado a cada plásmido se calculó como $s \times 100$. Los resultados reflejan la media de nueve mediciones independientes.

9. Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento de *E. coli* portadora de las variantes V4GTC, V4GTC.2 y V4GTC.2t se realizaron en un lector multi-modal de microplacas Synergy™ HTX (BioTek, Estados Unidos). Las cepas previamente se incubaron O.N. en presencia de glucosa al 1% (represor de la expresión del ORF40 clonado en pBAD43), tras lo cual se diluyeron 1:100 en medio LB en presencia de glucosa al 1% (represión) o arabinosa al 0,2% (inducción). Las microplacas se incubaron a 37°C durante 8 horas, con mediciones de la densidad óptica a 600 nm (DO₆₀₀) cada 15 minutos, previa agitación orbital de las microplacas a 282 rpm los 5 minutos previos a cada medición. Los resultados reflejan la media de al menos tres mediciones independientes.

10. Determinación del número de copias plasmídicas (PCN)

El número de copias plasmídicas de pB1000 y sus variantes en *E. coli* se analizó mediante PCR cuantitativa (qPCR), con el sistema de detección MyiQ™ single-color real-time PCR (Bio-Rad, Estados Unidos), siguiendo el método descrito previamente (San Millan *et al.*, 2014a). Cada cepa creció en 5 ml de BHI hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,8-0,9, que se corresponde con el final de la fase exponencial de crecimiento, tras lo cual se extrajo el ADN total con el Kit QIAamp® DNA Mini (QIAGEN, INC., Alemania). Las curvas de crecimiento y extracciones de ADN de cada cepa se realizaron por triplicado. La cantidad de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos), y 1 µl de ADN de cada muestra se digirió con la enzima PstI (TaKaRa, Japón) para evitar que el número de copias plasmídicas sea subestimado, como se indica en la bibliografía (Providenti *et al.*, 2006). En ninguno de los fragmentos amplificados existe una diana para PstI. Se diseñaron qPCRs específicas para amplificar un fragmento de 195 pb del gen *bla_{ROB-1}* de pB1000, y un fragmento de 201 pb del gen cromosómico monocopia *uidA*, para comparar el ratio entre ambos. Los oligonucleótidos diseñados para amplificar *bla_{ROB-1}* y *uidA* pueden encontrarse en la Tabla 4. Todas las reacciones tuvieron entre 94 y 100% de eficiencia, con r² superior a 0,998. La eficiencia de las reacciones se calculó a partir de una curva estándar obtenida al realizar una qPCR con diluciones seriadas de la misma muestra de ADN. Las qPCRs se realizaron usando el reactivo iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, Estados Unidos), con una concentración de ADN final de 10 pg/µl. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturalización de 1 minuto a 95°C, hibridación de 1 minuto a 58,5°C (*bla_{ROB-1}*) o 55°C (*uidA*), y elongación de 1 minuto a 72°C. Para calcular el número de copias plasmídicas por cromosoma usamos la fórmula:

$$PCN = [(1 + Ec)^{CTc} / (1 + Ep)^{CTp}] \times (Tc / Tp)$$

Donde T_c y T_p son los tamaños en pb de los fragmentos cromosómicos y plasmídicos amplificados respectivamente, E_c y E_p son las eficiencias de las qPCRs cromosómicas y plasmídicas (relativo a 1) respectivamente, y CT_c y CT_p son los ciclos umbrales de las reacciones cromosómicas y plasmídicas respectivamente.

11. Análisis estadístico de los datos

Todos los análisis estadísticos se realizaron con el software estadístico XLSTAT (Addinsoft, Estados Unidos). Para analizar la independencia de las medias en los datos de estabilidad, PCN y CMI se emplearon las funciones de pruebas paramétricas Prueba t de Student para dos muestras y Prueba de Levene para la comparación de varianzas de múltiples muestras; para analizar la relación entre dos variables se empleó la función de análisis de la varianza ANOVA de un factor; y para analizar la correlación entre las variables PCN y CMI se empleó el test de correlación de Pearson.

12. Western Blots

Se realizaron *Western Blots* o ensayos de electrotransferencia para evaluar la expresión del péptido producido a partir del ORF40 de pB1000 con el vector de expresión pBAD43. Para ello, se amplificó la etiqueta 3xFlagTag (FT) del vector de clonaje p3xFlag-CMV-14 (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) y se clonó a continuación del *orf40* de pBAD-40, en el mismo marco de lectura, dejando el codón de parada tras la etiqueta. La etiqueta FT está compuesta por 22 aminoácidos, que consisten en 3 repeticiones de epítomos hidrofílicos. La construcción, denominada pBAD-40FT, se transformó en *E. coli* MG1655 para evaluar la expresión del ORF40.

Los *Western Blots* se realizaron adaptando el protocolo descrito previamente (Hoefer, 2017). Partiendo de un cultivo O.N., se inocularon aproximadamente 10^6 UFCs de Ec-

pBAD40FT en medio LB líquido, al que se le añadió glucosa al 1% o arabinosa al 0,2%, para reprimir o inducir la expresión del ORF40, respectivamente. Los inóculos bacterianos se incubaron a 37°C y 150 rpm, hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6, correspondiente a la fase exponencial de crecimiento. En ese momento, se extrajo 1 ml de cada muestra y se centrifugó a 13.400 rpm durante 5 minutos y 4°C, para a continuación resuspenderlos en *buffer* Laemli 1x a una concentración de 1 µl/0,01 Unidades de Absorbancia. Tras resuspender las muestras en el *buffer*, éstas se congelaron inmediatamente a -20°C durante al menos 24 horas.

Posteriormente, las muestras se descongelaron y se desnaturalizaron las proteínas a 100°C durante 5 minutos. Una vez atemperadas, 5-10 µl de cada muestra se corrieron en un gel de Tris/Tricina Mini-PROTEAN® Tris/Tricine Precast Gels (Bio-Rad, Estados Unidos). Este tipo de geles están más indicados que los geles de Tris/Glicina para la separación de péptidos de pequeño tamaño, como es el caso del ORF40. Las muestras migraron durante 60-90 minutos a 200 V. El marcador de peso molecular empleado fue el Precision Plus Protein™ WesternC™ Blotting Standard (Bio-Rad, Estados Unidos). Este marcador requiere la adición del conjugado Precision Protein™ StrepTactin-HRP (Bio-Rad, Estados Unidos) para su visualización tras la reacción de quimioluminiscencia. Dicho conjugado se añadió junto con los anticuerpos secundarios, siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez que la electroforesis del gel finalizó, las proteínas fueron transferidas del gel a una membrana de nitrocelulosa Immun-Blot® PVDF (Bio-Rad, Estados Unidos) O.N. a 30 V y 4°C.

Al día siguiente, se bloquearon las membranas en *buffer* TBS-T (*Tris-buffered saline* con 1% Tween 20 (PanReac, Estados Unidos)) y leche desnatada en polvo al 10% (Nestlé Sveltesse®, Suiza) durante 2 horas a 100 rpm a temperatura ambiente. Tras esto, se realizaron 3-5 lavados de las membranas con TBS-T, y se incubaron con los anticuerpos primarios durante 2,5 horas a 100 rpm a temperatura ambiente en bolsas selladas. Los anticuerpos primarios fueron el Monoclonal Anti-Flag® M2 producido en ratón (Sigma-Aldrich, Estados Unidos), y

el anti-DnaK monoclonal (8E2/2) (Enzo Biochem, Estados Unidos), para la visualización de la proteína DnaK usada como control de los WB. Las concentraciones de los anticuerpos primarios fueron 1:500 para anti-FlagTag y 1:2000 para anti-DnaK, disueltos en 10 ml de TBS-T/membrana, siguiendo las indicaciones de los fabricantes.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios, se realizaron otros 3-5 lavados de las membranas con TBS-T, y se incubaron con el anticuerpo secundario Goat anti-Mouse IgG Horseradish Peroxidase (HRP) conjugate (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) durante 1,5 horas a 100 rpm a temperatura ambiente en bolsas selladas, a una concentración de 1:5000, disueltos en 10 ml de TBS-T/membrana. En esta incubación también se añadió el conjugado HRP para la visualización del marcador al revelar la membrana, a una concentración de 1:10000, siguiendo las indicaciones del fabricante. Tras la incubación, las membranas volvieron a lavarse 3-5 veces con TBS-T, se lavaron una vez más con agua destilada, y se incubaron durante 2 minutos con el reactivo Pierce™ ECL Western Blotting substrate (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos).

Finalmente, usando el software para *Western Blots* del programa Image Lab (Bio-Rad, Estados Unidos), se analizó la luminiscencia emitida por las membranas con el sistema de detección ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, Estados Unidos), tomando imágenes cada 10 segundos durante un total de 5 minutos.



RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN EXPERIMENTAL DE pB1000 EN *E. COLI*

1.1. Estabilidad de pB1000 en su hospedador natural *H. influenzae* y en un nuevo hospedador, *E. coli*

El plásmido pB1000 ha sido descrito en varias especies pertenecientes a la familia *Pasteurellaceae*, y su comportamiento biológico ha sido estudiado principalmente en *H. influenzae* (San Millan *et al.*, 2010; San Millan *et al.*, 2015a). Tanto en *H. influenzae* como en *P. multocida* pB1000 tiene una elevada estabilidad, pues el 100% de la población mantiene el plásmido durante al menos 60 generaciones en ausencia de presión antibiótica (San Millan *et al.*, 2009; San Millan *et al.*, 2015a).

Para investigar la posible adaptación de pB1000 a otros hospedadores, extrajimos el plásmido de la cepa clínica *P. multocida* BB1034 y lo transformamos en las cepas de laboratorio *E. coli* DH5 α y *H. influenzae* RdKW20, esta última actuando como control de hospedador natural. Todas las colonias obtenidas en placas con presión antibiótica portaron el plásmido, lo cual comprobamos mediante PCR y secuenciación. Tras confirmar que pB1000 es capaz de replicar en ambos hospedadores, analizamos su estabilidad en ambas poblaciones a lo largo de 100 generaciones en ausencia de presión antibiótica, realizando transferencias seriadas con diluciones 1:1000 cada 10 generaciones.

Como se observa en la Figura 20, los resultados de estabilidad fueron similares a lo descrito por San Millan y colaboradores (San Millan *et al.*, 2009): en su hospedador natural *H. influenzae* el 100% de las bacterias mantuvieron pB1000, mientras que éste fue altamente inestable en *E. coli*, puesto que tras 10 generaciones no detectamos el plásmido en ninguna bacteria. No obstante, la alta inestabilidad de pB1000 hizo que al comienzo del ensayo hubiera un alto porcentaje de colonias que no portaban el plásmido, incluso seleccionando las colonias de placas con presión selectiva (Figura 20.A). Por ello, decidimos representar la estabilidad en forma de porcentaje de mantenimiento del plásmido, puesto que de esta

forma se tiene en cuenta la proporción de bacterias resistentes y sensibles al comienzo del ensayo. Así, mientras que el porcentaje de mantenimiento de pB1000 en *H. influenzae* es del 100% (EE = 0%), en *E. coli* tan solo es del 34,89% (EE = 5,23%), lo que refleja su elevada inestabilidad al ser adquirido por un nuevo hospedador (Figura 20.B).

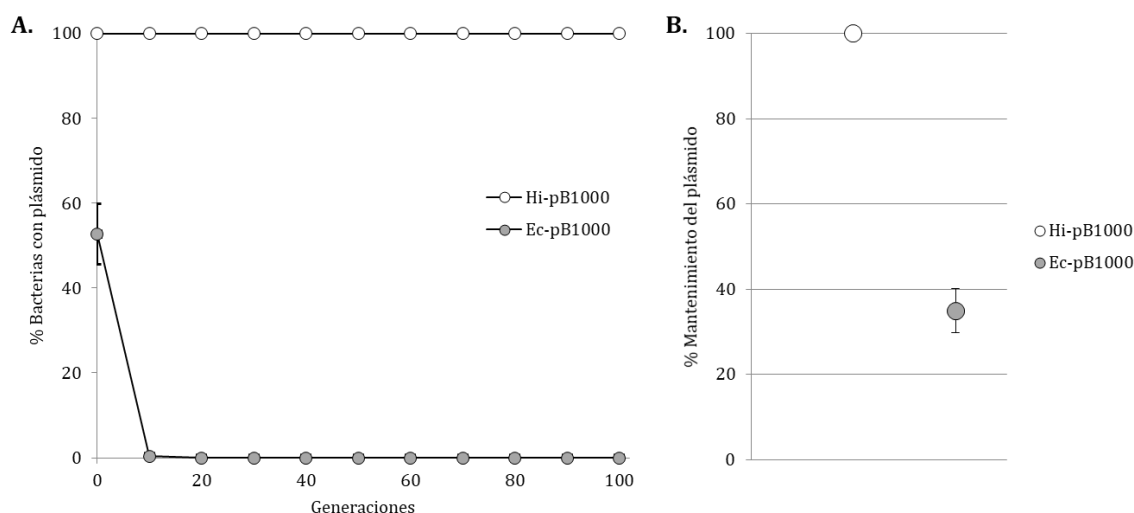


Figura 20. Estabilidad de pB1000 en su hospedador natural *H. influenzae* y en el nuevo hospedador *E. coli*, representada de dos maneras: en % Bacterias con plásmido (A) y en % Mantenimiento del plásmido (B). Todos los valores son la media de al menos tres mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

1.2. Análisis de la estabilidad tras la coevolución de *E. coli* y pB1000

Para estudiar si pB1000 era capaz de adaptarse a *E. coli*, realizamos nueve ensayos evolutivos de 500 generaciones, con diluciones seriadas 1:1000 cada 10 generaciones, y añadiendo 50 mg/l de ampicilina al medio para forzar el mantenimiento de pB1000 en las poblaciones. Al finalizar los ensayos, sembramos las bacterias en placas con presión antibiótica, congelamos las poblaciones y extrajimos los plásmidos para su posterior estudio. Adicionalmente, en seis de las nueve poblaciones evolucionadas, congelamos las bacterias y extrajimos los plásmidos cada 50 generaciones a lo largo de la evolución.

Finalizados los ensayos evolutivos, analizamos si la estabilidad de pB1000 había variado con respecto a la estabilidad en *E. coli* sin evolucionar. Analizamos la estabilidad de 3 clones independientes de cada una de las poblaciones evolucionadas. Sorprendentemente, en las

nueve poblaciones los plásmidos evolucionados aumentaron su estabilidad, con un porcentaje de mantenimiento prácticamente del 100% en todos los casos (Figura 21). Por tanto, la evolución de pB1000 en *E. coli* dio como resultado la adaptación entre plásmido y bacteria, aumentando la persistencia de pB1000 en una población donde inicialmente era inestable.

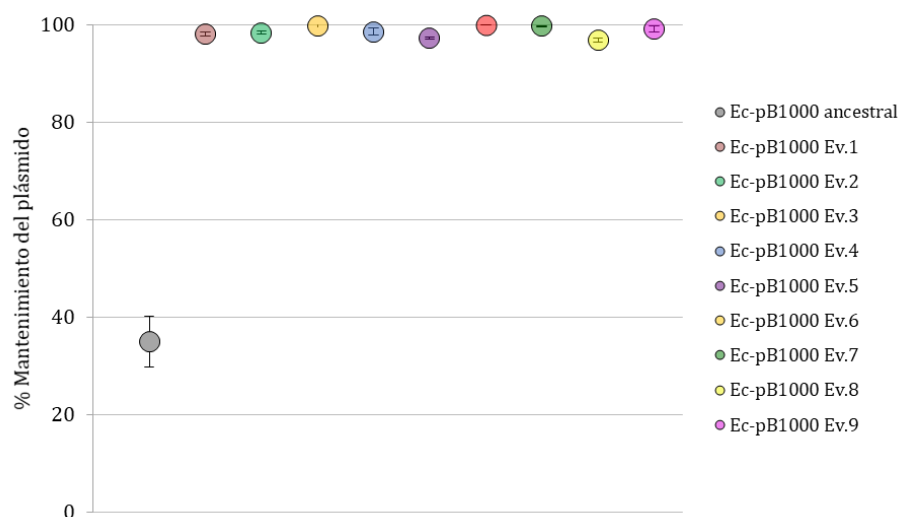


Figura 21. Estabilidad de pB1000 en *E. coli* ancestral y en las nueve poblaciones de Ec-pB1000 evolucionadas durante 500 generaciones, calculada como % Mantenimiento del plásmido en la población. Todos los valores son la media de al menos tres mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

2. CARACTERIZACIÓN DE LOS PLÁSMIDOS EVOLUCIONADOS EN

E. COLI

2.1. *Secuenciación de los plásmidos evolucionados*

2.1.1. Plásmidos obtenidos tras 500 generaciones de evolución

La coevolución plásmido/hospedador puede favorecer la aparición de mutaciones compensatorias que aumenten la estabilidad del plásmido en la población (Harrison & Brockhurst, 2012). Para investigar si los plásmidos evolucionados durante 500 generaciones presentaban alguna mutación compensatoria que pudiera explicar el aumento de estabilidad, extrajimos y secuenciamos los plásmidos completos de las poblaciones evolucionadas. En las nueve poblaciones, todos los plásmidos presentaron dos tipos de modificaciones en su secuencia: adquisición de una secuencia de inserción y aparición de un polimorfismo de un único nucleótido (SNP) en el origen de replicación putativo (*oriV*) de pB1000 (Dixon *et al.*, 1994). En la Tabla 5 se indican las variaciones en el genotipo de cada plásmido, las cuales también están representadas en la Figura 22. No apareció ningún otro tipo de mutación en el resto de la estructura plasmídica de los plásmidos evolucionados.

Tabla 5. Genotipo de los plásmidos obtenidos tras 500 generaciones en las nueve líneas evolutivas.

Evolución	Tamaño (pb)	Secuencia de inserción	SNP en el <i>oriV</i>
1	5390	IS1A	T3819A
2	5390	IS1A	T3819A
3	5390	IS1A	T3874A
4	5390	IS1A	T3819A
5	5390	IS1A	T3819A
6	5390	IS1A	T3819A
7	5951	IS10R	T3874A
8	5951	IS10R	C3890A
9	5951	IS10R	T3894C

En las evoluciones 1-6, los plásmidos extraídos tras evolucionar durante 500 generaciones contenían la secuencia de inserción *IS1A* (número de acceso en GenBank: X52534; de ahora en adelante, *IS1*), insertada en todos los casos en la misma posición: en el nt 2318 de pB1000, que se sitúa entre los genes *mob* y el gen de resistencia a β -lactámicos *bla_{ROB-1}*. Su inserción generó la duplicación de su secuencia diana, CAAGCATAG, a ambos lados de la IS. Esta secuencia de inserción es la más pequeña de todas las descritas, mide 768 pb y codifica la transposasa *InsAB'*, de 232 aa, expresada a partir de dos ORFs parcialmente superpuestos: *insA* e *insB'* (Mahillon & Chandler, 1998; Ton-Hoang *et al.*, 2004).

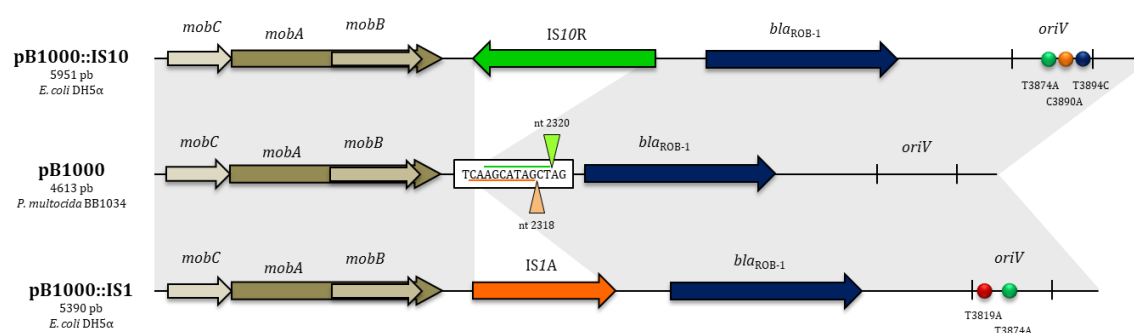


Figura 22. Estructura genética de pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10. Las sombras grises indican la similitud entre los tres plásmidos. En el *oriV*, delimitado por dos barras laterales, se indican los SNPs presentes en los plásmidos al final de las evoluciones (no necesariamente en el mismo plásmido). Los triángulos naranja y verde indican las posiciones donde las ISs se insertan, y las líneas naranja y verde indican las repeticiones directas producidas al insertarse las ISs.

En las otras tres evoluciones también se insertó una IS, pero en este caso fue la *IS10R*, conocida también por el nombre de *ISVsa5* (número de acceso en GenBank: AH003348; de ahora en adelante, *IS10*), perteneciente a la familia *IS4*. Esta IS, de 1329 pb, también produjo la repetición de su diana, AGCTATGCT, quedando una copia de la secuencia repetida a cada lado de su lugar de inserción. En las tres evoluciones, la *IS10* se insertó exactamente en la misma posición, en el nt 2320 de pB1000, a tan solo dos nucleótidos de donde se había insertado la *IS1* en las otras evoluciones. En ambos casos, las ISs se transpusieron desde el cromosoma de *E. coli* a pB1000, puesto que ninguna de ellas está presente en el plásmido original, mientras que el genoma de *E. coli* DH5 α presenta 5 copias de cada una de ellas (número de acceso en GenBank: NZ_JRYM000000000).

La secuenciación del *oriV* de pB1000 reveló la presencia de un SNP en cada uno de los plásmidos, algunos de los cuales aparecieron de forma paralela en varias de las evoluciones realizadas de forma independiente (Tabla 4).

2.1.2. Dinámica de los cambios genéticos a lo largo de las evoluciones

Una vez analizados los cambios genéticos de pB1000 al final de las nueve evoluciones experimentales, quisimos determinar las dinámicas de adquisición de las mutaciones y las secuencias de inserción en los plásmidos a lo largo de las evoluciones. Durante seis de los nueve ensayos evolutivos sembramos las poblaciones y extrajimos los plásmidos cada 5 días (aproximadamente 50 generaciones). Adicionalmente, para realizar un seguimiento más exhaustivo de las modificaciones genéticas, en tres de las evoluciones (evoluciones 7-9) extrajimos los plásmidos cada 24 horas durante las 50 primeras generaciones de ensayo evolutivo. Secuenciamos estos plásmidos y analizamos la presencia/ausencia de secuencias de inserción, y la aparición de SNPs en el *oriV*. La frecuencia de SNPs se analizó a partir del cromatograma usando el software QSVanalyser, mientras que la proporción de plásmidos portadores de ISs se analizó valorando la intensidad de las bandas obtenidas mediante PCR (Figura 23).

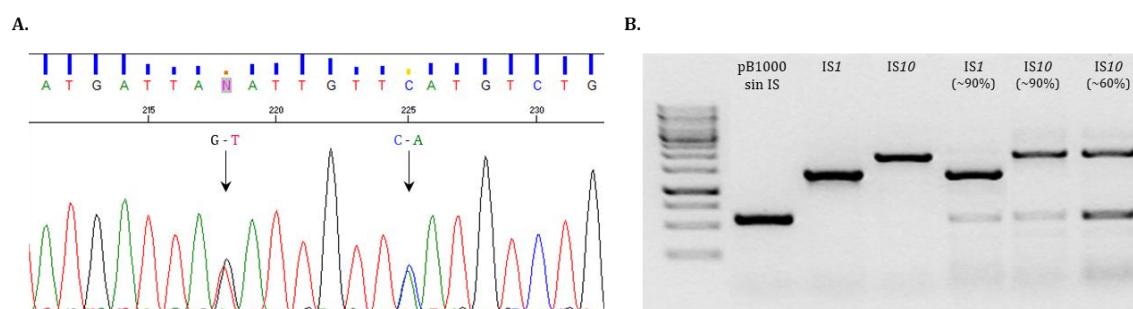


Figura 23. (A) Cromatograma de una de las extracciones de plásmidos secuenciadas, en el que aparecen dobles picos en dos de los nucleótidos, reflejo de la presencia de múltiples variantes plasmídicas simultáneamente. (B) Amplificación mediante PCR de la región de pB1000 donde se insertan IS1 e IS10, en la que se aprecia la presencia simultánea de plásmidos con y sin ISs en la misma población.

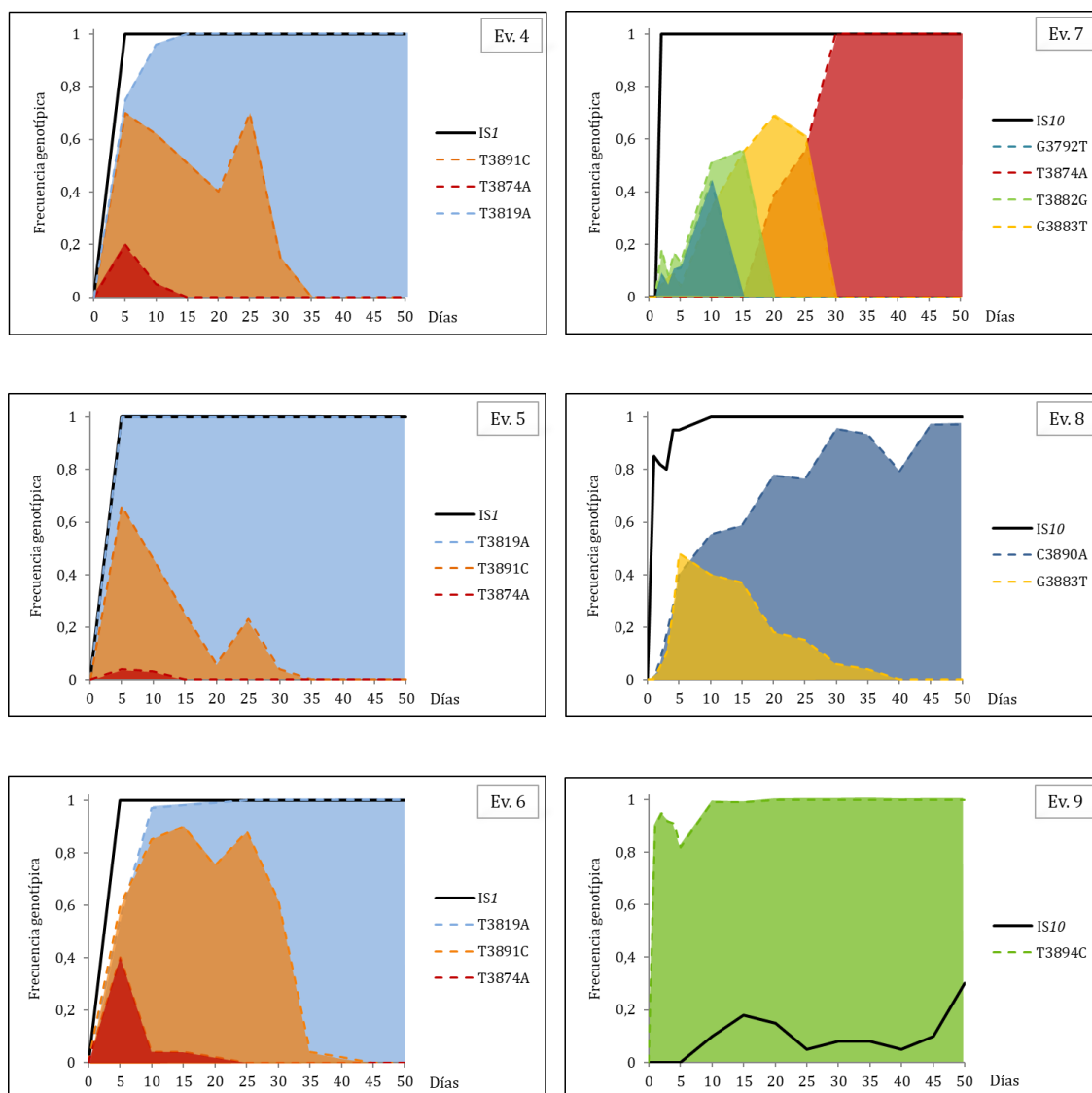


Figura 24. Dinámica de los cambios genotípicos de pB1000 a lo largo de seis de los ensayos evolutivos de pB1000 en *E. coli*. La línea negra continua representa el % de plásmidos que portaban una secuencia de inserción (IS1/IS10) en cada momento. Las zonas coloreadas representan el % de plásmidos que portaban un SNP en el *oriV* en cada momento. Las zonas con fondo blanco indican la ausencia de SNPs en el *oriV*.

En todas las líneas evolutivas salvo en la número 9, la gran mayoría de los plásmidos portaban una IS (IS1 o IS10) desde el comienzo de las evoluciones, y las ISs fueron mantenidas hasta el final del experimento, lo que podría sugerir que la adquisición de ISs tiene un papel en la evolución adaptativa de pB1000 a *E. coli*.

Las dinámicas de aparición de SNPs en el origen de replicación fueron muy diferentes, puesto que en la mayoría de las líneas evolutivas aparecieron entre dos y cuatro SNPs diferentes desde el comienzo de las evoluciones, con presencia de dobles alelos en cada uno

de ellos, lo que indica la existencia simultánea de plásmidos portadores del nt original y plásmidos portadores del SNP (Figura 23). Curiosamente, este patrón se observó principalmente durante las primeras generaciones, mientras que, en general, a partir de la generación 300, un único SNP se estableció en cada evolución, desapareciendo el resto de ellos, lo que podría sugerir que, tras varias generaciones de competición, el plásmido mejor adaptado a las condiciones del experimento fue el que se fijó en la población. En la Figura 24 se muestra la frecuencia genotípica de los SNPs en el *oriV* y la frecuencia de plásmidos portando ISs en seis de las líneas evolutivas.

2.2. Estabilidad de las variantes de pB1000

Cuando propagamos organismos de crecimiento rápido en un medio rico en nutrientes, la probabilidad de que cada una de las bases nucleicas muten en algún momento durante la evolución es prácticamente de 1 (Cooper, 2018). Por ello, aquellas mutaciones seleccionadas durante el experimento serán las que permitan una mejor adaptación a las condiciones experimentales. En nuestro caso, la adquisición de secuencias de inserción y las mutaciones puntuales en el *oriV* de todos los plásmidos evolucionados sugieren que estos cambios genéticos son responsables de la adaptación de pB1000 al nuevo hospedador.

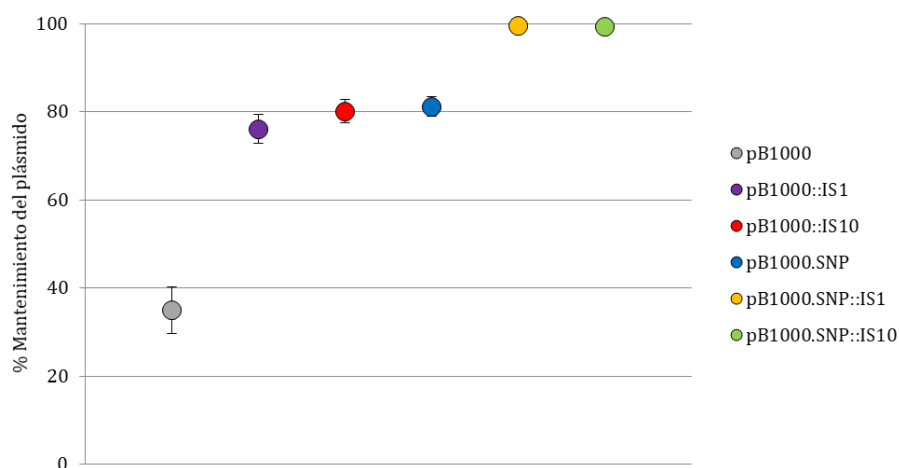
Para comprobar si la alta estabilidad de estos plásmidos en las cepas de *E. coli* evolucionadas se debe a las mutaciones de pB1000 y no a mutaciones en el cromosoma bacteriano, transformamos *E. coli* sin evolucionar con los plásmidos evolucionados y analizamos nuevamente su estabilidad calculando el porcentaje de mantenimiento de los plásmidos en la población. De esta forma, si la estabilidad en el hospedador ancestral se mantiene cercana al 100%, indicará que los cambios genéticos de pB1000 son los responsables de la adaptación del plásmido al hospedador. Además, quisimos analizar el efecto individual de cada uno de los cambios genéticos en el comportamiento de pB1000, es decir, el efecto de portar solamente una secuencia de inserción, solamente un SNP en el *oriV*, y ambos cambios

simultáneamente. Para ello, seleccionamos plásmidos obtenidos a lo largo de las evoluciones que portaban las ISs por separado, el SNP T3874A, o la combinación de ambas (Tabla 6). Seleccionamos dicha mutación en el *oriV* debido a que fue la única que apareció en combinación con ambas ISs en ausencia de SNPs adicionales.

Tabla 6. Variantes de pB1000, obtenidas durante las evoluciones adaptativas en *E. coli*, y seleccionadas para estudiar el efecto de sus cambios genéticos sobre la adaptación al nuevo hospedador.

Plásmido	Tamaño (pb)	Secuencia de inserción	SNP en el <i>oriV</i>
pB1000 (control)	4613	-	-
pB1000::IS1	5390	IS1	-
pB1000::IS10	5951	IS10	-
pB1000.SNP	4613	-	T3874A
pB1000.SNP::IS1	5390	IS1	T3874A
pB1000.SNP::IS10	5951	IS10	T3874A

Tras transformar *E. coli* ancestral con los seis plásmidos seleccionados, analizamos la estabilidad plasmídica en ausencia de presión selectiva. Los plásmidos que portaban únicamente una IS incrementaron su estabilidad desde el 34,89% (pB1000 original) hasta alcanzar valores en torno al 80% (Figura 25), lo que supuso un aumento significativo (*t* de Student para dos muestras: $P < 0,0001$, $t = -5,68$, $gl = 23$ para pB1000::IS1; y $P < 0,0001$, $t = -6,47$, $gl = 23$ para pB1000::IS10). El plásmido portador del SNP en el *oriV* mostró una estabilidad muy similar a los que portan una IS, y también muy superior a la de pB1000 original (*t* de Student para dos muestras: $P < 0,0001$, $t = -5,44$, $gl = 19$). No obstante, los dos plásmidos que tenían ambos cambios genéticos (IS+SNP) mostraron una estabilidad de prácticamente 100%, la misma estabilidad que alcanzaban en las bacterias evolucionadas (ANOVA de un factor: $P = 0,32$, $F = 1,21$, $gl = 10, 31$). Por tanto, aunque no podemos descartar que durante los ensayos evolutivos aparecieran mutaciones compensatorias en el cromosoma de *E. coli*, podemos afirmar que los cambios genéticos de pB1000 adquiridos durante la evolución en *E. coli* eran responsables de su aumento de estabilidad y, por ende, que la evolución compensatoria permitió la adaptación de pB1000 a un nuevo hospedador.

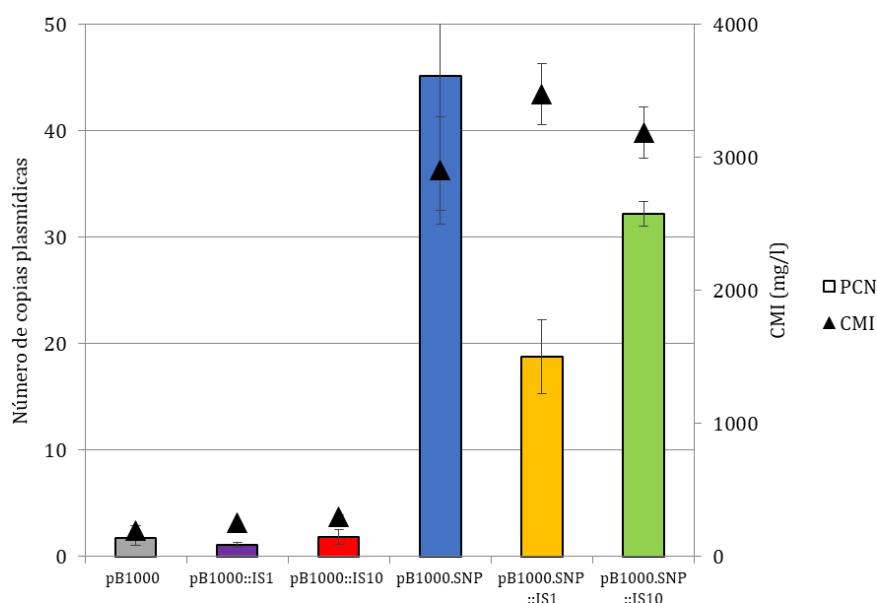


	pB1000	pB1000::IS1	pB1000::IS10	pB1000.SNP	pB1000.SNP::IS1	pB1000.SNP::IS10
Mantenimiento (%)	34,89	76,03	80,03	81,15	99,51	99,30
EE (%)	5,23	3,31	2,67	2,30	0,49	0,99

Figura 25. Estabilidad de pB1000 y de las variantes evolucionadas de pB1000 en *E. coli* ancestral, calculada como % Mantenimiento del plásmido en la población. Todos los valores son la media de entre 4 y 9 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

2.3. Caracterización del número de copias (PCN) y nivel de resistencia de las variantes de pB1000

Como hemos comentado en la introducción, uno de los principales factores que determinan la estabilidad de los plásmidos multicopia es la regulación del número de copias, puesto que de este número dependerá la probabilidad de que aparezcan segregantes sin ninguna copia plasmídica (Summers, 1998). El aumento de estabilidad de las variantes de pB1000 obtenidas tras las evoluciones, por tanto, podría estar relacionado con un aumento del número de copias. Para comprobarlo, analizamos el PCN de los seis plásmidos (Tabla 6) mediante PCR cuantitativa. Para ello, diseñamos oligonucleótidos específicos para amplificar un fragmento del gen *bla_{ROB-1}* de pB1000 y del gen cromosómico monocopia *uidA*, de manera que pudimos obtener el número de copias plasmídicas por cromosoma (ver Materiales y Métodos). Los resultados del PCN pueden encontrarse en la Figura 26.



	pB1000	pB1000::IS1	pB1000::IS10	pB1000.SNP	pB1000.SNP::IS1	pB1000.SNP::IS10
PCN	1,71	1,09	1,80	45,12	18,77	32,21
EE	0,69	0,19	0,68	12,64	3,47	1,16
CMI (mg/l)	192	256	294,40	2902	3476,57	3184,89
EE (mg/l)	36,95	0	15,68	401,08	228	192,57

Figura 26. Representación del PCN (rectángulos verticales) y de la CMI de ampicilina (triángulos) de pB1000 ancestral y de las variantes evolucionadas. Todos los valores son la media de al menos 3 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

El PCN de pB1000 en *E. coli* fue muy bajo, con una media de 1,71 copias por cromosoma frente a las 44,5 copias de pB1000 en su hospedador original *H. influenzae* (San Millan *et al.*, 2015a), lo cual explicaría la baja estabilidad del replicón en el nuevo hospedador. Los plásmidos con una IS en su secuencia no aumentaron este PCN, manteniéndose similar al valor de pB1000 en *E. coli* (*t* de Student para dos muestras: $P = 0,48$, $t = 0,86$, $gl = 2$ para pB1000::IS1; y $P = 0,93$, $t = -0,09$, $gl = 4$ para pB1000::IS10). Sin embargo, los tres plásmidos que tienen el SNP en el *oriV*, tanto solo como en combinación con una IS, sí incrementaron sustancialmente el PCN en comparación con los que no tienen el SNP (*t* de Student para dos muestras: $P < 0,0001$, $t = -5,67$, $gl = 16$), no existiendo diferencias significativas entre los tres plásmidos (ANOVA de un factor: $P = 0,12$; $F = 3,03$; $gl = 2, 6$). Este resultado sugiere que el SNP T3874A en el *oriV* de pB1000 es el responsable del aumento del número copias de los tres plásmidos, y que este aumento del PCN puede producir el incremento de estabilidad mostrado por estas variantes plasmídicas. De hecho, para el plásmido pB1000.SNP, que

tiene una media de 45 copias por cromosoma, la probabilidad de que aparezca un segregante sin ninguna copia plasmídica tras la división celular es de $5,68 \times 10^{-14}$, mientras que para pB1000 original, con 1,7 copias, la probabilidad es de 0,6. Sin embargo, pB1000.SNP, pese a ser el plásmido con mayor PCN, mostró la misma estabilidad que los plásmidos con una IS, los cuales no aumentaron su PCN. Por tanto, esto sugiere que otro mecanismo, además del aumento del PCN, estaba relacionado con el aumento de estabilidad de los plásmidos evolucionados.

El patrón de fenotipo de resistencia de las variantes de pB1000 fue similar al del PCN (Figura 26). La CMI a ampicilina de *Ec*-pB1000, conferida por la β -lactamasa codificada en pB1000, fue de 192 mg/l, y no aumentó significativamente en *Ec*-IS1 (*t* de Student para dos muestras: $P = 0,23$, $t = -1,73$, $gl = 2$) ni en *Ec*-IS10 (*t* de Student para dos muestras: $P = 0,08$, $t = -2,55$, $gl = 3$). Las tres cepas que contenían el SNP en el *oriV*, sin embargo, aumentaron drásticamente su nivel de resistencia a ampicilina, llegando prácticamente a 3000 mg/l y, de nuevo, sin diferencias entre ellas (ANOVA de un factor: $P = 0,36$; $F = 1,10$; $gl = 2, 17$).

Al observar el aumento tanto de PCN como de CMI en las cepas portadoras de los plásmidos con SNP, analizamos si existía una correlación entre ambos valores, y obtuvimos una correlación lineal positiva entre el aumento del PCN y el aumento de la CMI (correlación de Pearson (6): $r = 0,84$; $P = 0,04$), que se muestra en la Figura 27.

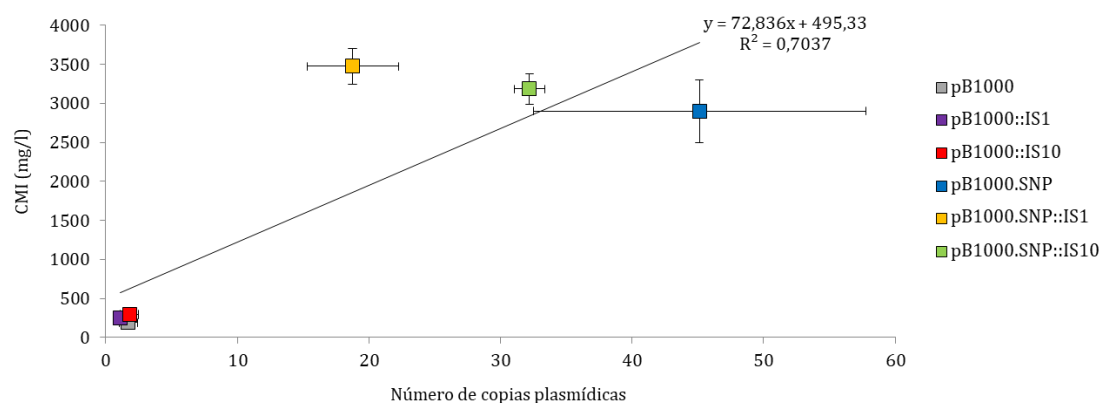


Figura 27. Relación lineal positiva entre el PCN (eje X) y la CMI (eje Y) de las cepas de *E. coli* portadoras de pB1000 y sus variantes. Las barras verticales y horizontales indican el error estándar (EE) de cada valor de PCN (verticales) y de CMI (horizontales).

2.4. Determinación del coste biológico de las variantes con secuencias de inserción

Como hemos explicado anteriormente, la estabilidad de los plásmidos multicopia está muy relacionada con su número de copias y con el coste biológico que producen. El PCN y la CMI de las cepas con pB1000::IS1 y de pB1000::IS10 no variaron con respecto al plásmido original, sin embargo, la estabilidad de estas variantes plasmídicas sí fue muy superior a la de pB1000. Muchas de las evoluciones compensatorias descritas en la bibliografía reflejan la reducción del *fitness cost* o coste biológico como mecanismo de adaptación plasmídica, por tanto, decidimos analizar si nuestros plásmidos evolucionados habían disminuido su coste, lo que explicaría el aumento de estabilidad de aquellos plásmidos que no habían aumentado su PCN. Para ello, realizamos competiciones directas entre las bacterias portadoras de plásmido frente a las bacterias libres de plásmido, como está descrito en la bibliografía (Lenski, 1991), calculando el ratio de pérdida de plásmido/10 generaciones durante 48 horas para minimizar el efecto de pérdida de plásmido por segregación. Los resultados del coste biológico, mostrados en la Figura 28, se expresan como *fitness* relativo de cada cepa, tomando el valor de *fitness* = 1 la cepa libre de plásmido.

Como se observa en la figura, el coste biológico de pB1000 fue muy elevado, llegando a producir hasta un 77% de reducción del *fitness* bacteriano (el *fitness* de Ec-pB1000 es 0,23 en relación al *fitness* de *E. coli* libre de plásmido), lo que ayuda a explicar la rápida pérdida del plásmido original en este hospedador. Sin embargo, los dos plásmidos portadores de una secuencia de inserción redujeron en gran proporción su coste biológico, llegando a ser hasta 3 veces menor que el coste del plásmido sin evolucionar. Esta diferencia de *fitness cost* entre los plásmidos con y sin IS fue significativa (*t* de Student para dos muestras: $P < 0,0001$, $t = 9,59$, $gl = 14$ para pB1000::IS1; y $P < 0,0001$, $t = 11,07$, $gl = 15$ para pB1000::IS10), no habiendo ninguna diferencia entre portar la IS1 y portar la IS10 (*t* de Student para dos muestras: $P = 0,85$, $t = 0,19$, $gl = 15$).

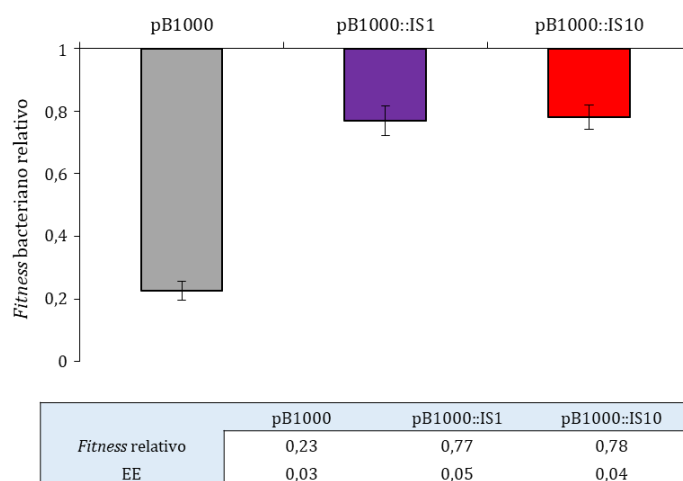


Figura 28. *Fitness* de *E. coli* portando pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10 relativo a *E. coli* libre de plásmido, cuyo valor de *fitness* es 1. Todos los valores son la media de nueve mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

Este resultado podría indicar que la adquisición de ISs por parte de pB1000 a lo largo de los ensayos evolutivos disminuye el coste biológico asociado a pB1000, y esta reducción del coste biológico es responsable del aumento de estabilidad del plásmido en la población de *E. coli*. Además, explica el aumento de estabilidad de los plásmidos pB1000.SNP::IS1 y pB1000.SNP::IS10 en comparación con el plásmido que solo porta el SNP, ya que, además de aumentar su PCN gracias a la mutación en el *oriV*, reducen el *fitness cost* impuesto a la bacteria, permitiendo que haya una adaptación de pB1000 al nuevo hospedador.

2.5. Estudio de la región donde se adquieren las ISs

La adquisición de secuencias de inserción incrementa la estabilidad de pB1000 al reducir su coste biológico (Figura 28). Posteriormente, quisimos averiguar cuál era el mecanismo por el que las ISs disminuían el *fitness cost* del plásmido. El hecho de que en todas las evoluciones experimentales realizadas una IS (IS1/IS10) se insertara siempre en la misma posición, con tan solo 2 nt de diferencia entre ellas, nos hizo plantear la posibilidad de que la interrupción de esta región concreta fuera la responsable del aumento de estabilidad.

2.5.1. Construcción de las variantes *mock*

Para ver si la interrupción de esta región específica derivaba en un aumento de estabilidad de pB1000, realizamos dos construcciones plasmídicas en las que, partiendo de pB1000 original, insertamos dos fragmentos de ADN no codificante (ver Materiales y Métodos), del mismo tamaño y en la misma posición donde se insertaban IS1 e IS10 respectivamente (Figura 29), denominados *mock1* y *mock10*.

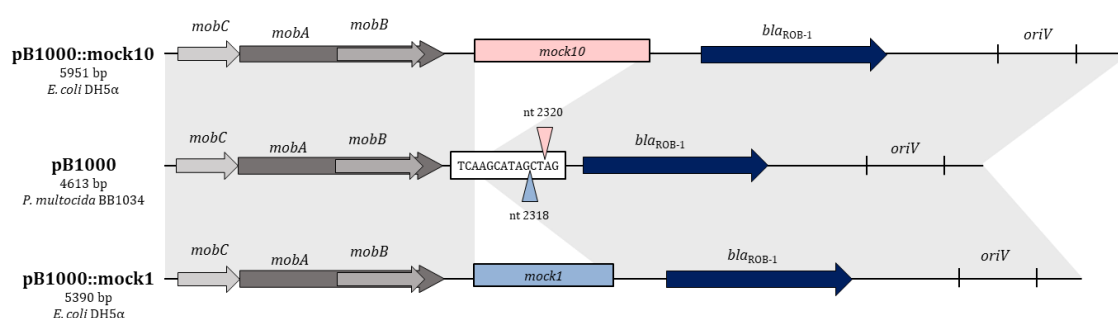


Figura 29. Estructura genética de pB1000 y de las construcciones plasmídicas pB1000::mock1 y pB1000::mock10. Las sombras grises indican la similitud entre los tres plásmidos. Los triángulos azul y rosa indican las posiciones donde se clonaron los fragmentos *mock*.

2.5.2. Caracterización de las construcciones *mock*: estabilidad, PCN, CMI y *fitness cost*

Al igual que hicimos con los plásmidos pB1000::IS1 y pB1000::IS10, caracterizamos el comportamiento de estas dos construcciones, pB1000::mock1 y pB1000::mock10 en *E. coli*, analizando si existían diferencias de estabilidad, PCN, CMI y coste biológico con respecto a los plásmidos con ISs. Los resultados, representados en la Figura 30, mostraron que estas dos construcciones se comportaban de forma idéntica a los plásmidos portadores de secuencias de inserción.

La estabilidad de las variantes portadoras de los fragmentos *mock* fue la misma que la observada en los plásmidos con ISs (ANOVA de un factor: $P = 0,53$, $F = 0,76$, $gl = 3, 26$); el PCN se mantuvo igual al de pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10 (ANOVA de un factor: $P = 0,56$, $F = 0,79$, $gl = 4, 10$); y los valores de CMI, pese a ser más elevados que los de pB1000::IS1 y pB1000::IS10, fueron muy inferiores a los plásmidos que presentaban un SNP

en el *oriV* (*t* de Student para dos muestras: $P < 0,0001$, $t = -17,73$, $gl = 22$). Por último, el análisis del *fitness cost* relativo a *E. coli* libre de plásmidos mostró que la inserción de los fragmentos *mock* en la estructura de pB1000 disminuía el coste biológico asociado al plásmido, alcanzando los mismos valores que las variantes con secuencias de inserción (ANOVA de un factor: $P = 0,76$, $F = 0,39$, $gl = 3, 26$).

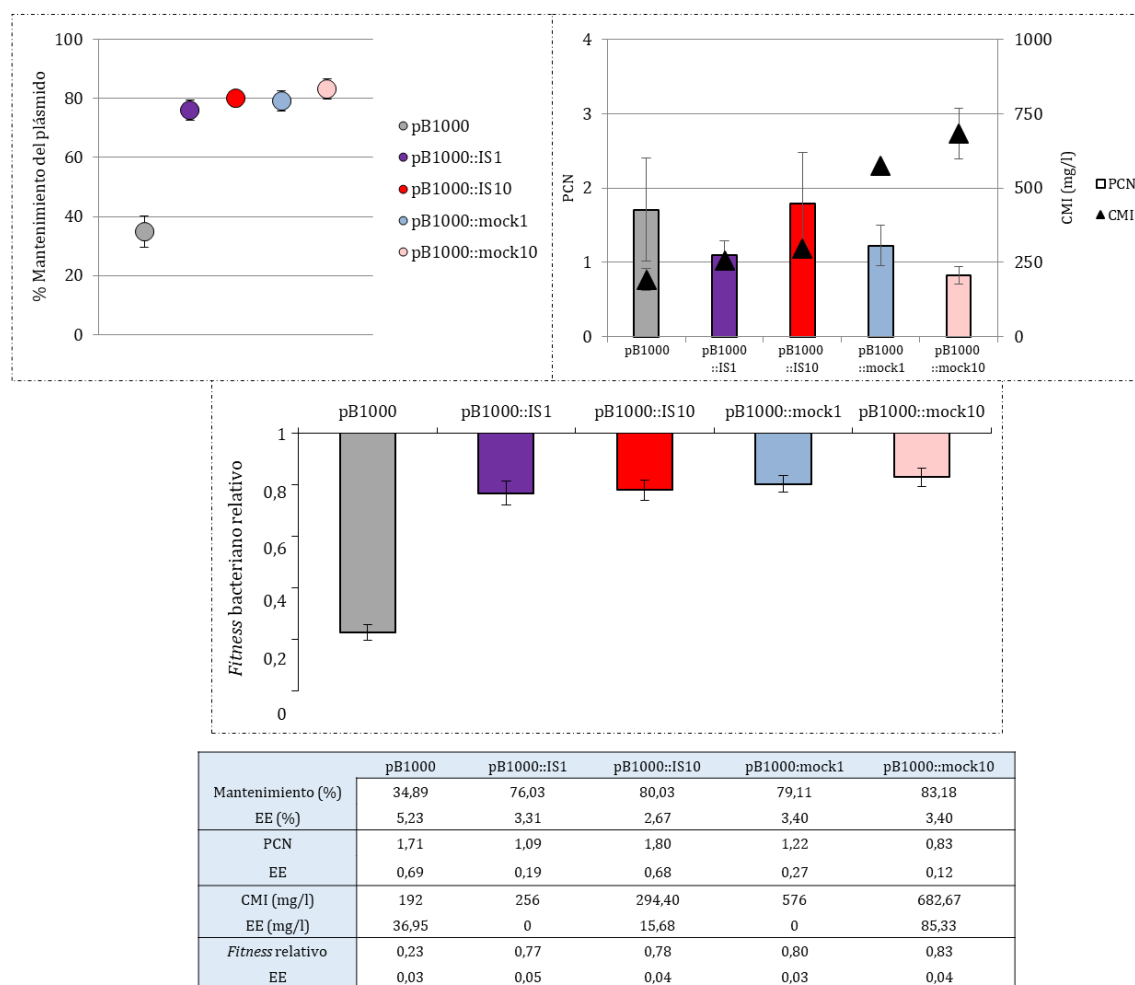
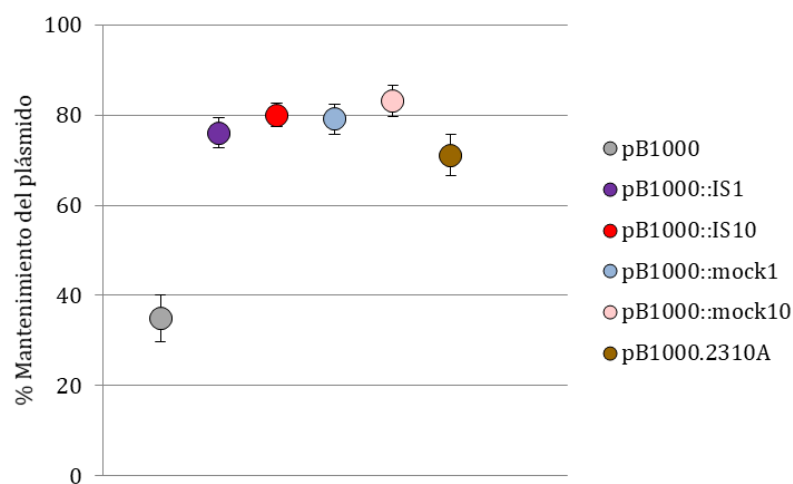


Figura 30. Análisis de la estabilidad, PCN, CMI y coste biológico de las construcciones pB1000::mock1 y pB1000::mock10, y comparación con los resultados obtenidos para pB1000, pB1000::IS1 y pB1000::IS10. En todos los casos los valores son la media de al menos tres mediciones, con los errores estándar (EE) indicados con barras verticales.

Estos resultados sugirieron que la disminución del coste biológico de las variantes con ISs y, por tanto, su adaptación al nuevo hospedador, eran debidas a la interrupción de la región específica donde las ISs se insertaban durante la evolución compensatoria de pB1000, y no a una función intrínseca de las secuencias de inserción. Para corroborar que la interrupción

de esta región es suficiente para disminuir el coste biológico de pB1000 y aumentar su estabilidad en *E. coli*, construimos un mutante extra en el que, sobre pB1000 original, adicionamos una adenina en la posición 2310 del plásmido, es decir, en la secuencia repetida que generaban las ISs al insertarse.

Al analizar el porcentaje de mantenimiento de este plásmido, denominado pB1000.2310A observamos el mismo aumento de estabilidad con respecto a pB1000 original que el obtenido con los plásmidos pB1000::IS1, pB1000::IS10 y con las variantes *mock* (ANOVA de un factor: $P = 0,39$, $F = 1,06$, $gl = 4, 34$), corroborando que la interrupción de esta región era clave en la adaptación de pB1000 a *E. coli* (Figura 31).



	pB1000	pB1000::IS1	pB1000::IS10	pB1000::mock1	pB1000::mock10	pB1000.2310A
Mantenimiento (%)	34,89	76,03	80,03	79,11	83,18	71,11
EE (%)	5,23	3,31	2,67	3,40	3,40	4,60

Figura 31. Estabilidad del mutante pB1000.2310A en comparación con la estabilidad de pB1000 ancestral, los plásmidos con ISs y las variantes *mock*. Todos los valores son la media de entre 3 y 9 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

2.6. Estudio del rango de hospedador de los plásmidos evolucionados

La adaptación compensatoria, como hemos visto, puede dar lugar a la estabilización de plásmidos en nuevos hospedadores. Algunos trabajos, además de describir este fenómeno, han descrito la expansión del rango de hospedador plasmídico – cuando el plásmido sigue replicando eficientemente en el hospedador original (De Gelder *et al.*, 2008) – o el cambio

del rango de hospedador plasmídico – en los casos en los que los mecanismos de adaptación a nuevos hospedadores alteran su capacidad de replicación en hospedadores en los que previamente eran estables (Sota *et al.*, 2010).

Al observar la adaptación de pB1000 a un nuevo hospedador a través de evolución compensatoria, quisimos evaluar si esta adaptación implicaba una expansión del rango de hospedador o si, por el contrario, se había producido un cambio en este rango. Para ello, transformamos todas las variantes plasmídicas en el hospedador *H. influenzae* RdKW20, al que pB1000 está adaptado y donde es 100% estable, y analizamos la obtención de colonias transformantes en placas con presión antibiótica.

Ninguno de los plásmidos que tenían un SNP en el *oriV* (pB1000.SNP, pB1000.SNP::IS1 y pB1000.SNP::IS10) fue capaz de replicar en su hospedador original *H. influenzae*. En cuanto al resto de variantes (pB1000::IS1, pB1000::IS10, pB1000::mock1, pB1000::mock10 y pB1000.2310A), las únicas que fueron capaz de replicar en *H. influenzae* fueron pB1000::IS1 y pB1000.2310A, no obteniendo transformantes con ninguna de las otras tres variantes plasmídicas.

No obstante, tanto en pB1000::IS10 como en las variantes *mock* había dianas para la endonucleasa de restricción HincII, la cual es producida por *H. influenzae* RdKW20 a partir del gen *hincII*R como mecanismo de protección frente a la invasión de ADN exógeno (Smith & Marley, 1980). Esta enzima, también denominada HindII, reconoce la diana GTY/RAC (Y = C/T; R = A/G), cortando la hebra de ADN. Esta diana no se encuentra en el plásmido pB1000 ni en IS1, pero sí en IS10 y en los fragmentos *mock*, por lo que nos planteamos la posibilidad de que ésta fuera la causa de la ausencia de células transformantes con esas construcciones.

Para comprobarlo, eliminamos las dianas de HincII de los tres plásmidos donde estaba presente mutando únicamente un nucleótido en cada una de ellas – en el caso de pB1000::IS10, el cambio de nucleótido no modificó el aminoácido codificado –, y las

denominamos pB1000::IS10', pB1000::mock1' y pB1000::mock10'. Al analizar su capacidad de replicación en *H. influenzae*, comprobamos que tanto pB1000::mock1' como pB1000::mock10' eran capaces de replicar en el hospedador original de pB1000. No ocurrió así con pB1000::IS10', que no fue capaz de replicar, aunque los controles de células electrocompetentes que hicimos en el experimento indicaron que la eficiencia de transformación de las células no era muy elevada, por lo que ésta podría ser la causa de la ausencia de células transformantes.

Por tanto, las modificaciones adaptativas de pB1000 adquiridas durante la evolución compensatoria en *E. coli* produjeron dos efectos diferentes en cuanto a su rango de hospedador: (i) la mutación en el origen de replicación produjo un cambio de hospedador, pues su presencia impidió que el plásmido replicara en su hospedador natural *H. influenzae*; y (ii) la adquisición de ISs, de fragmentos *mock* o la adición de una adenina en la región del plásmido situada entre las relaxasas y el gen de resistencia produjo una expansión del rango de hospedador, pues, con la excepción de pB1000::IS10, estas variantes plasmídicas incrementaron su estabilidad en *E. coli* sin perjudicar a su capacidad de replicación en su hospedador natural *H. influenzae*.

3. CARACTERIZACIÓN DEL ORF40 DE pB1000

3.1. Análisis *in silico* de la región donde se insertan las ISs

Dada la selección positiva a la adquisición de elementos de inserción en la misma región de pB1000 durante los experimentos de evolución adaptativa, y el aumento de estabilidad del plásmido con la adición de un único nucleótido en el lugar de inserción de las ISs, decidimos investigar la presencia de ORFs en esta región. Empleando el software ORFfinder del NCBI, y bajo los parámetros (i) longitud mínima de 75 nt, (ii) código genético bacteriano, y (iii) codón de inicio como ATG y codones alternativos, encontramos tres ORFs que quedaban interrumpidos al insertarse las ISs en esta región (Figura 32), denominados ORF3 (hebra positiva), ORF40 (hebra negativa) y ORF65 (hebra negativa).

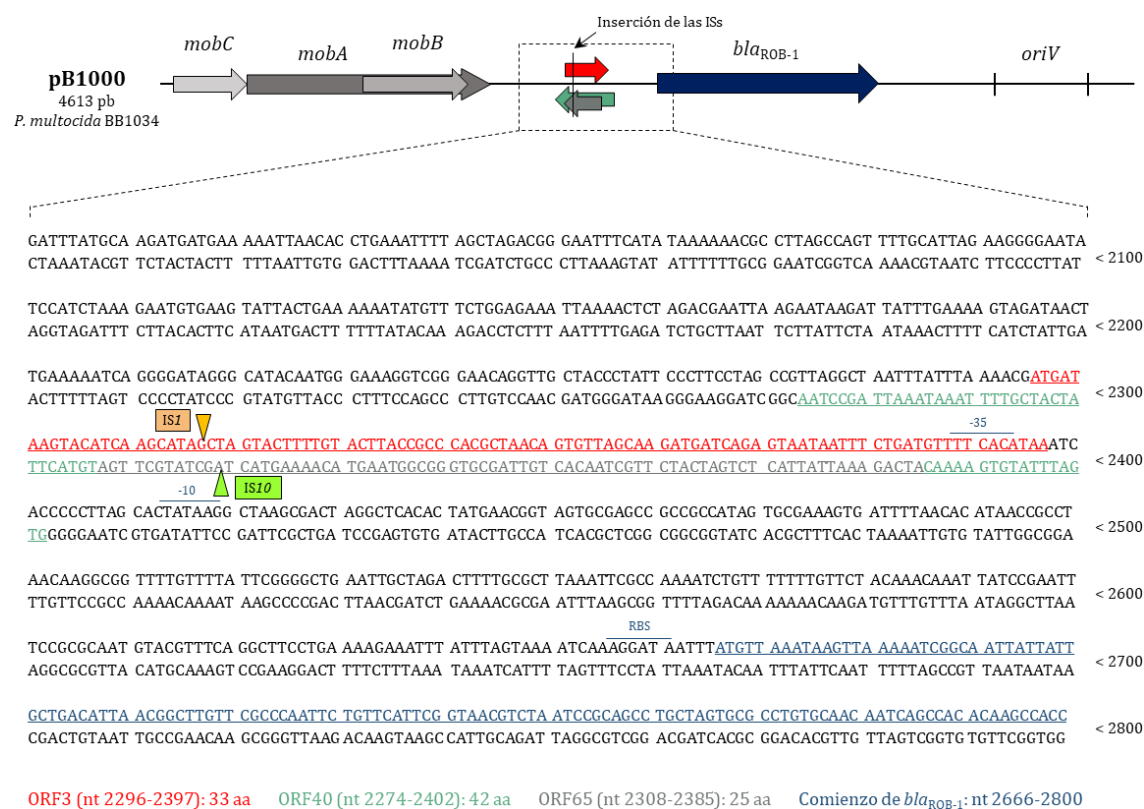


Figura 32. Análisis *in silico* de la región de pB1000 donde se insertan las ISs. Se indica la secuencia de pB1000 desde el nt 2100 al nt 2800, en sentido 5'-3' (hebra superior) y en sentido 3'-5' (hebra inferior). Se indican los tres ORFs encontrados con ORFfinder, el comienzo del gen bla_{ROB-1}, el promotor y el RBS descritos para bla_{ROB-1} (Juteau & Levesque, 1990), así como las posiciones donde se insertan las secuencias de inserción IS1 e IS10.

Posteriormente, realizamos un alineamiento del fragmento de pB1000 que abarcaba los tres ORFs con la base de datos del NCBI para averiguar si esta región estaba presente en otros plásmidos o cromosomas, y comprobamos que tan solo ha sido encontrada en especies de la familia *Pasteurellaceae*, y en todos los casos en los que se indica su localización, ésta fue en plásmidos descritos únicamente en esta familia: pB1000 (número de acceso en GenBank: GU080062), pB1000' (GU080066), p1144 (MK203847), pJMA-1 (KP164834), pCCK343 (FR687372), pB1002 (EU283341), pAPP7_A (CP001094) y pHS-Tet (AY862435). Al realizar una búsqueda de las posibles proteínas codificadas por cada uno de los ORFs, tan sólo obtuvimos un resultado para el ORF40, el cual estaba descrito como codificante de una proteína hipotética en un estudio comparativo genómico de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (Xu *et al.*, 2010), especie perteneciente a la misma familia bacteriana.

Con estos resultados, concluimos que era posible que alguno de los ORFs interrumpidos al adquirir las secuencias de inserción diera lugar a un péptido, y que dicho péptido fuera responsable de la inestabilidad de pB1000 en *E. coli*, por lo que, al ser interrumpido por las ISs, dicha estabilidad aumentaba y se facilitaba el proceso de adaptación de pB1000 a *E. coli*.

3.2. Estudio del efecto del ORF40 con un vector de expresión

3.2.1. Clonaje de los ORFs en el vector de expresión pBAD43

Para investigar la posible expresión de pequeños péptidos a partir de los ORFs localizados en la región de pB1000 donde las ISs se insertaban, empleamos el vector de expresión pBAD43 (Guzman *et al.*, 1995), que permite regular la represión – con glucosa al 1% – y la inducción – con arabinosa al 0,2% – de los genes clonados.

Por tanto, para averiguar si la expresión de los ORFs en *E. coli* era la responsable de la inestabilidad de pB1000, clonamos los dos ORFs de mayor tamaño, el ORF40 y el ORF3, de

manera independiente en pBAD43, a continuación del promotor *araBAD*, y los introdujimos en la cepa de laboratorio *E. coli* MG1655 mediante transformación (Figura 33).

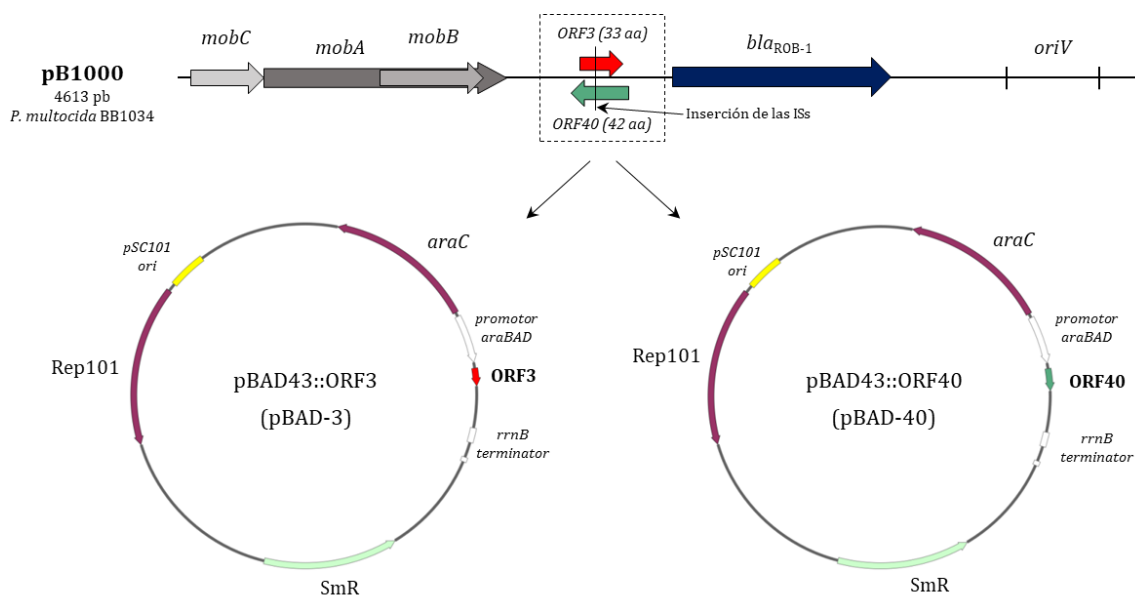


Figura 33. Construcciones genéticas en las que se clonaron de manera independiente el ORF3 y el ORF40 de pB1000 en el vector de expresión pBAD43, a continuación del promotor del operón *araBAD*. En los plásmidos pBAD-3 y pBAD-40 se indican los principales componentes: el gen regulador *araC*, el promotor del operón *araBAD*, los ORFs clonados, el terminador del gen *rrnB*, el gen de resistencia a espectinomicina *aad(9)* (denominado SmR en las construcciones), la proteína de replicación Rep101, y el *oriV* del plásmido pSC101.

3.2.2. Estabilidad de las construcciones plasmídicas en *E. coli*

Una vez obtenidas las construcciones pBAD-3 y pBAD-40, analizamos la estabilidad de ambos vectores en *E. coli*, en condiciones de inducción y de represión de los ORFs, utilizando como control el plásmido pBAD43 vacío (Figura 34). Denominamos a estas cepas Ec-pBAD, Ec-pBAD3 y Ec-pBAD40, portadoras de los plásmidos pBAD43, pBAD-3 y pBAD-40, respectivamente.

La estabilidad se analizó de forma similar a la de pB1000 en *E. coli*, a lo largo de 80 generaciones en medio libre de antibiótico, al que se le añadió glucosa al 1% (en condiciones de represión) o arabinosa al 0,2% (en condiciones de inducción). El porcentaje de bacterias resistentes en cada momento se calculó replicando las bacterias en placas con espectinomicina, pues es la resistencia conferida por el gen *aad(9)* que porta pBAD43.

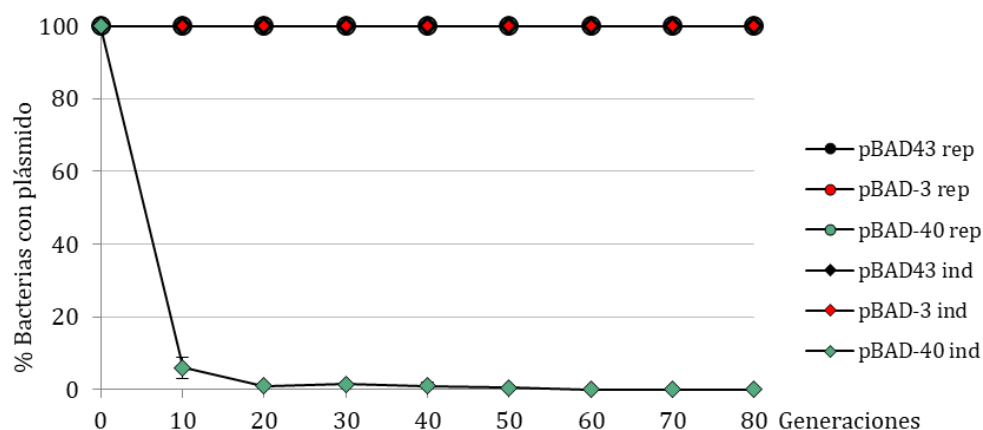


Figura 34. Estabilidad de los plásmidos pBAD43, pBAD-3 y pBAD-40 en condiciones de represión (rep) e inducción (ind) de la expresión de los ORFs. Todos los valores son la media de 3 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

Todos los plásmidos fueron 100% estables en condiciones de represión. Al inducir la expresión del ORF3, el vector pBAD-3 continuó siendo estable, y el 100% de las colonias conservaron el plásmido tras 80 generaciones. Sin embargo, la expresión del ORF40 provocó la pérdida drástica del plásmido en la población de *E. coli*, pues tras 10 generaciones prácticamente la totalidad de las colonias habían perdido el plásmido. Por tanto, este resultado confirmó que la expresión del ORF40 es responsable de la inestabilidad de pBAD-40 en *E. coli*, sugiriendo que este ORF es traducido en un péptido cuya expresión en *E. coli* es responsable de la rápida pérdida de pB1000 en este hospedador. La adquisición de secuencias de inserción durante la evolución adaptativa de pB1000 en *E. coli* provocó la interrupción de dicho ORF, impidiendo su expresión, lo que permitió la adaptación del plásmido al hospedador.

3.2.3. Análisis de la expresión del ORF40 mediante *Western Blot*

Para poder confirmar la producción de un péptido a partir del ORF40, analizamos su expresión mediante *Western Blot* (WB). Para ello, clonamos la etiqueta 3xFlagTag (a partir de ahora, FT) a continuación de la secuencia del ORF40 en pBAD-40, y empleamos anticuerpos específicos frente a esta etiqueta. Adicionalmente, utilizamos el plásmido pFT+

como control de la etiqueta FT, que expresa una proteína fusionada al FT con un tamaño de 49,7 kDa, y la proteína DnaK como control del *Western Blot*, con un tamaño de 69 kDa.

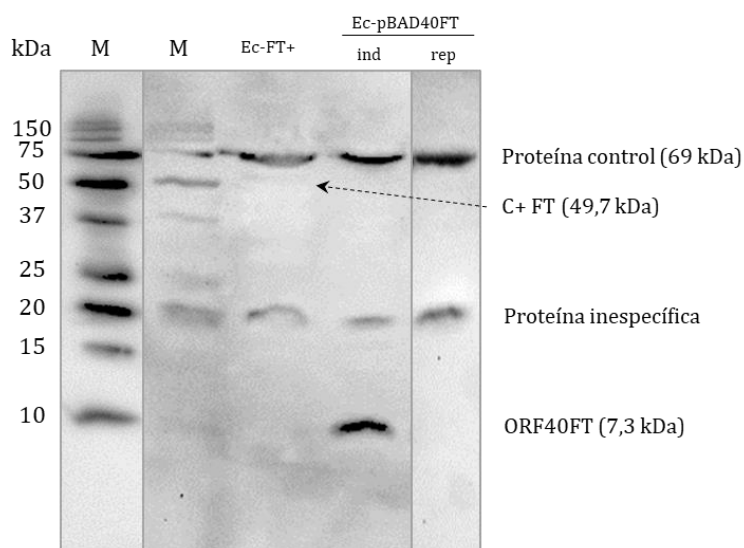


Figura 35. Análisis, mediante *Western Blot*, de la expresión del péptido producido por el ORF40 de pBAD-40FT en *E. coli* (Ec-pBAD40FT). A la izquierda se indica el tamaño de cada una de las bandas, medido en kDa (se ha añadido el mismo marcador de proteínas a la izquierda debido a la mala visualización de las bandas proteicas en el marcador del propio *Western Blot*). En la parte superior se indican las cepas, y en la parte de la derecha se indican las proteínas observadas.

Como se aprecia en la Figura 35, al realizar el WB pudimos observar una banda proteica en la cepa Ec-pBAD40FT, que no apareció en la cepa control Ec-FT+. La altura de esta banda fue algo inferior a 10 kDa. Teniendo en cuenta que las proteínas control se visualizaron unos kDa por encima de su tamaño real con respecto a las bandas del marcador, es muy posible que la banda observada en torno a 10 kDa sea el ORF40 unido al FT. Este resultado confirmó por tanto la expresión de un péptido de 42 aa a partir del ORF40.

3.2.4. Determinación del origen del ORF40

Una vez confirmado el papel del ORF40 en la inestabilidad de pB1000 en *E. coli*, estudiamos la secuencia de dicho ORF, y comprobamos que existían dos posibles codones de inicio de la traducción, en la posición 1 y en la posición 4 de la secuencia total de 42 aa encontrada con ORFfinder (Figura 36). En ambos casos, el codón de inicio consistía en la secuencia GTG,

la cual típicamente da lugar al aminoácido valina (a partir del codón GUG del ARNm), pero al actuar como codón de inicio puede ser traducido como metionina, siendo GUG el segundo codón de inicio de traducción más frecuente en *E. coli*, tan solo por detrás de AUG (Hecht *et al.*, 2017). Por tanto, el ORF40 podría traducirse en un péptido de 42 aa, en el caso de que el primer codón GTG fuera el codón de inicio, o bien en un péptido de 39 aa, si el codón de inicio fuera el siguiente codón GTG que aparece en la secuencia.



Figura 36. Secuencia nucleotídica y aminoacídica del ORF40 clonado en pBAD43, donde se aprecian los dos posibles codones de inicio de la traducción GTG, en las posiciones 1 y 4 de la secuencia aminoacídica.

Para comprobar el origen de la traducción del ORF40, modificamos ambos codones en dos construcciones independientes, generando el SNP GTG → GTC, de manera que, aun conservando la traducción normal en valina, se minimizaba su traducción a metionina y, por tanto, la expresión del ORF sería mínima – Hecht y colaboradores describen una expresión de GFP del 0,1-1% cuando el codón de inicio es GUC (Hecht *et al.*, 2017) –. Una vez obtenidas las dos nuevas construcciones plasmídicas, a las que denominamos V1GTC (mutación en el primer codón del total de 42) y V4GTC (mutación en el cuarto codón del total de 42) analizamos su estabilidad en *E. coli* bajo condiciones de inducción y represión del ORF40 (Figura 37). Las cepas portadoras de V1GTC y V4GTC se denominaron Ec-V1 y Ec-V4 respectivamente.

Los resultados de este experimento revelaron varios datos interesantes. Por un lado, la estabilidad de la construcción V1GTC fue muy superior a la de V4GTC, lo que podría indicar que el comienzo del ORF40 se correspondía con el codón GTG en posición 1 del ORF. La estabilidad de esta construcción, no obstante, fue particular: fue prácticamente 100% estable durante las 20 primeras generaciones, momento en el que comenzó a perderse en

la población bacteriana. Sin embargo, alrededor de la generación 40, pareció estabilizarse en la población, y no llegó a perderse completamente en ningún momento, pues el 20% de la población que portaba el plásmido en ese momento lo mantuvo de manera estable durante el resto del ensayo.

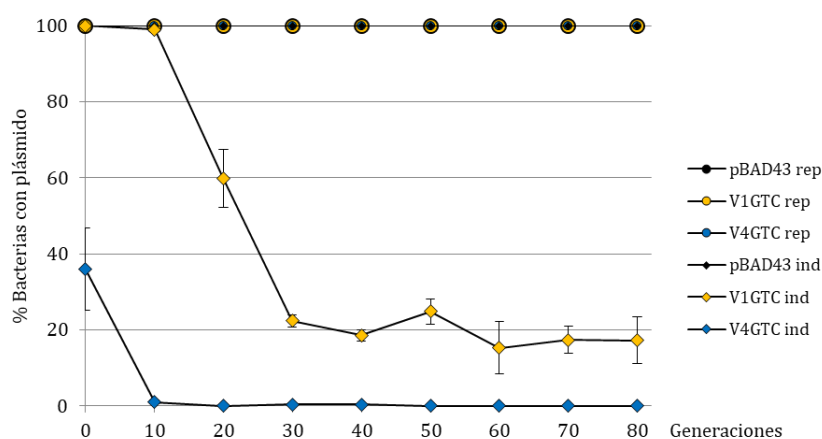


Figura 37. Estabilidad de los plásmidos pBAD43 (control), V1GTC y V4GTC en condiciones de represión (rep) e inducción (ind) de la expresión del ORF40. Todos los valores son la media de entre 3 y 6 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

Por otro lado, la mutación del codón GTG en posición 4 no incrementó la estabilidad del vector en Ec-V4GTC, lo que parece indicar que la traducción del ORF40 no comienza en este codón, puesto que la mutación GTG \rightarrow GTC habría incrementado la estabilidad de esta construcción. Al contrario de lo que ocurrió con V1GTC, la construcción V4GTC en medio con arabinosa se perdió rápidamente, pues tras 10 generaciones prácticamente ninguna bacteria conservaba el plásmido. Es más, pudimos observar que incluso al comienzo del ensayo, cuando se seleccionan bacterias de placas con presión selectiva, la mayoría de las colonias no portaban ninguna copia de V4GTC, lo cual no ocurría con pBAD-40. Esto será comentado en el apartado de la Discusión.

3.2.5. Análisis *in silico* del ORF40

Una vez conocida la secuencia completa del ORF40, analizamos su composición aminoacídica. Se trata de un péptido altamente hidrofóbico, pues 26 de los 42 aa que lo

componen se corresponden con aminoácidos hidrofóbicos (Petsko & Ringe, 2004). Además, según la escala Kyte-Doolittle (Kyte & Doolittle, 1982), empleada para el análisis de regiones hidrofóbicas proteicas, toda su secuencia se corresponde con estructuras hidrofóbicas, ya que la puntuación de todas sus posiciones es superior a 0 (Figura 38.A.), apreciando dos regiones especialmente hidrofóbicas en torno a los aa en posiciones 15 y 35. Por otro lado, la modelización de su estructura terciaria con el software I-TASSER (Yang & Zhang, 2015; Zhang *et al.*, 2017), reveló como modelo más probable una estructura formada por dos α -hélices antiparalelas conectadas por un pequeño giro (Figura 38.B.). El alineamiento del ORF40 con las bases de datos reveló la ausencia de proteínas homólogas o con alguna región similar a este péptido, por lo que no pudimos predecir su localización ni su posible función celular.

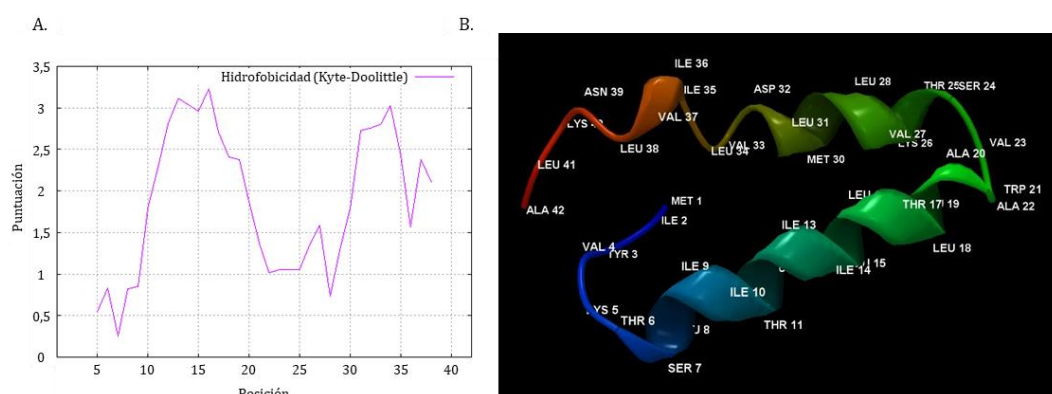


Figura 38. (A) Hidrofobicidad del ORF40 según la escala de Kyte y Doolittle. (B) Modelización de la estructura terciaria del ORF40. Se indican los aminoácidos que lo componen, y su posición en la secuencia de 42 aa.

3.2.6. Análisis fenotípico de las colonias

Una de las observaciones más llamativas durante la realización de los experimentos de estabilidad de las construcciones utilizadas hasta ahora fue el fenotipo de las colonias en los diferentes medios (Figura 39).

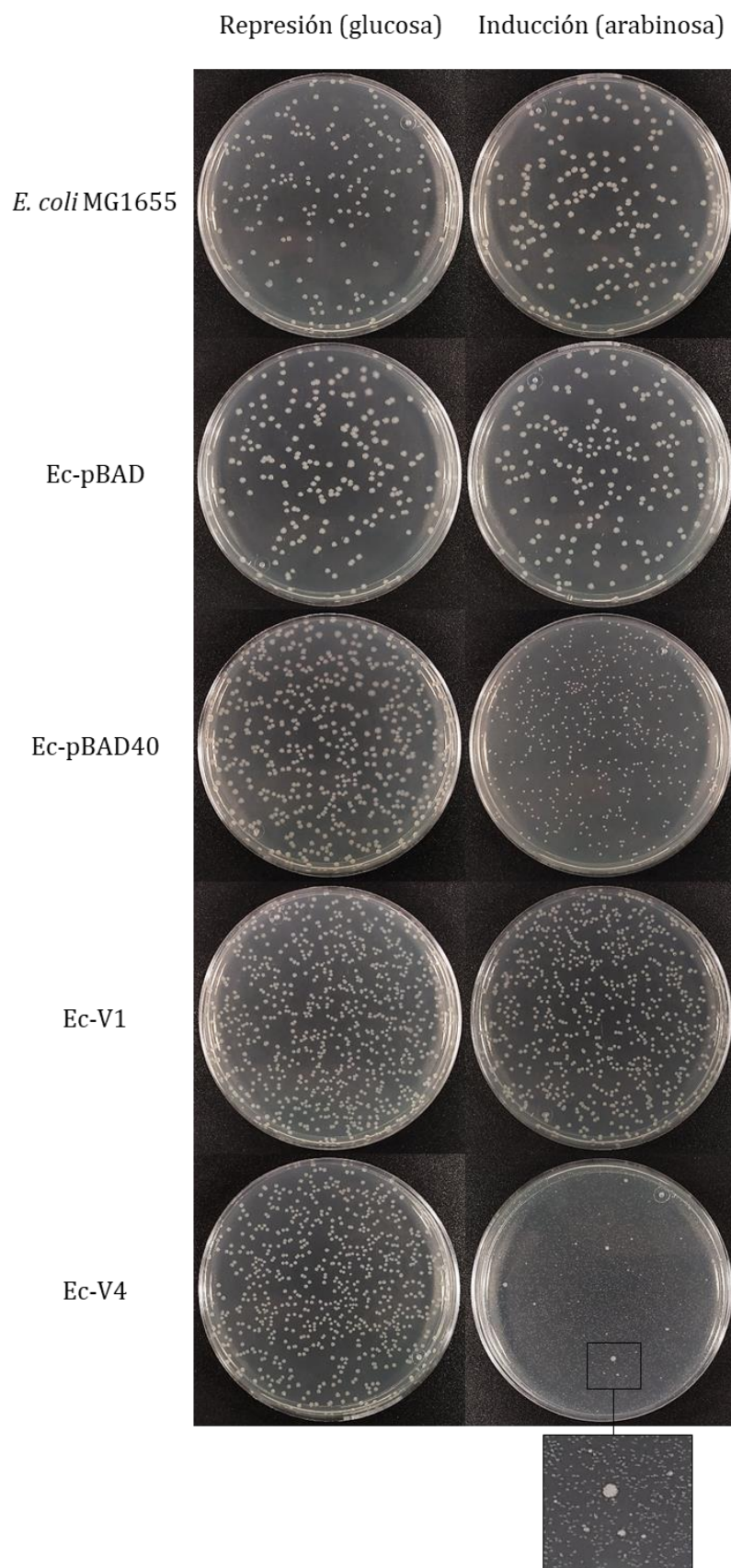


Figura 39. Fenotipo de las colonias de *E. coli* MG1655 (libre de plásmido) y de las cepas Ec-pBAD, Ec-pBAD40, Ec-V1 y Ec-V4, en medio LB bajo condiciones de inducción (arabinosa al 0,2%) y represión (glucosa al 1%) de la expresión del ORF40. Todas las placas fueron sembradas con 100 μ l de las diluciones 10^{-3} o 10^{-4} de inóculos líquidos de cada cepa, y en todos los casos se incubaron a 37°C durante 16 horas.

El plásmido pBAD43 no alteró el fenotipo normal de *E. coli* (fenotipo *Wild Type* o WT), generando un crecimiento de colonias similar al de *E. coli* sin plásmido tanto en presencia de glucosa como de arabinosa. La cepa Ec-pBAD40 (portadora del plásmido pBAD-40), sin embargo, dio lugar a colonias más pequeñas que las WT al inducir la expresión del ORF40, debido probablemente a la toxicidad generada por el péptido producido.

La cepa Ec-V1, portadora de la construcción plasmídica V1GTC, permitió la recuperación del fenotipo WT de las colonias bajo condiciones de inducción del ORF40, lo que confirmó el resultado del experimento anterior, es decir, que el codón GTG en posición 1 es el origen de la traducción del ORF40. Curiosamente, al analizar el fenotipo de las colonias de Ec-V4, portadoras del plásmido V4GTC, en condiciones de inducción, observamos colonias mucho más pequeñas que las generadas por Ec-pBAD40, y además apareció una pequeña proporción de colonias diferentes, repartidas por toda la placa, con fenotipo similar al de las colonias WT de *E. coli* o incluso un poco más grandes, a las que denominamos colonias mutantes. Estas colonias se aprecian en detalle en el zoom de la Figura 39.

3.3. Estudio del efecto genotípico del ORF40

3.3.1. Obtención de mutantes cromosómicos

Como hemos comentado en la introducción, la expresión de proteínas adquiridas recientemente puede producir un elevado coste biológico en su nuevo hospedador debido a diferentes mecanismos, como alteración de redes celulares, plegamiento incorrecto o citotoxicidad, entre otros (San Millan & MacLean, 2017). Al comprobar que la expresión del péptido producido a partir del ORF40 era responsable de la elevada inestabilidad de pBAD-40 y, por tanto, de pB1000 en *E. coli*, y tras observar el efecto fenotípico que dicho péptido producía en las colonias, nos interesamos en investigar su efecto genotípico, es decir, averiguar si existía alguna proteína bacteriana sobre la que el péptido expresado a partir del ORF40 estaba actuando o interaccionando y produciendo un efecto tóxico. Como hemos

visto previamente, los efectos perjudiciales producidos por elementos extracromosómicos pueden ser compensados mediante mutaciones adaptativas tanto en los plásmidos como en el cromosoma bacteriano (Harrison & Brockhurst, 2012). Por ello, para investigar el efecto genotípico del ORF40, llevamos a cabo varias aproximaciones con el fin de obtener un mutante que hubiera compensado el efecto tóxico del ORF40 a través de mutaciones en el cromosoma bacteriano.

3.3.1.1. Aproximación (i): construcción del mutante con triple ORF40

La primera aproximación consistió en realizar una construcción con el plásmido pBAD-40, en la que, además de la copia que ya existía del ORF40, introdujéramos dos copias más del ORF, junto con el promotor del operón *araBAD* y los terminadores T1 y T2 del gen *rrnB*, presentes en el plásmido original pBAD43. De esta forma, al aumentar el número de genes produciendo la toxina se incrementaba la probabilidad de compensar su efecto tóxico mediante mutaciones compensatorias cromosómicas sobre la probabilidad de impedir la expresión de los tres ORFs. Sin embargo, pese a los múltiples intentos de clonaje de la construcción, no conseguimos obtener ningún transformante de *E. coli* que portara el plásmido con las 3 copias del ORF40. Del mismo modo, también intentamos clonar solamente 2 copias del ORF40, pero obtuvimos el mismo resultado, ningún transformante creció. Por tanto, esta aproximación fue descartada.

3.3.1.2. Aproximación (ii): obtención de un mutante espontáneo de *Ec-pBAD40*

La siguiente aproximación con la que intentamos obtener un mutante cromosómico que compensara la toxicidad del ORF40 fue la de aparición de mutantes espontáneos portadores de pBAD-40.

Para ello, propagamos la cepa Ec-pBAD40 dando pases en medio LB líquido con espectinomicina (para conservar el plásmido) y con arabinosa (para inducir la expresión del ORF40), con la intención de que, al menos en algún caso, la coevolución del plásmido con la bacteria permitiera la adaptación entre ambos mediante la mutación del cromosoma bacteriano, revirtiendo así la toxicidad generada por el péptido. Durante estos pases sembramos las bacterias en medio con arabinosa, y a partir de las 10 generaciones de coevolución prácticamente la totalidad de las colonias habían recuperado el fenotipo WT (Figura 40).

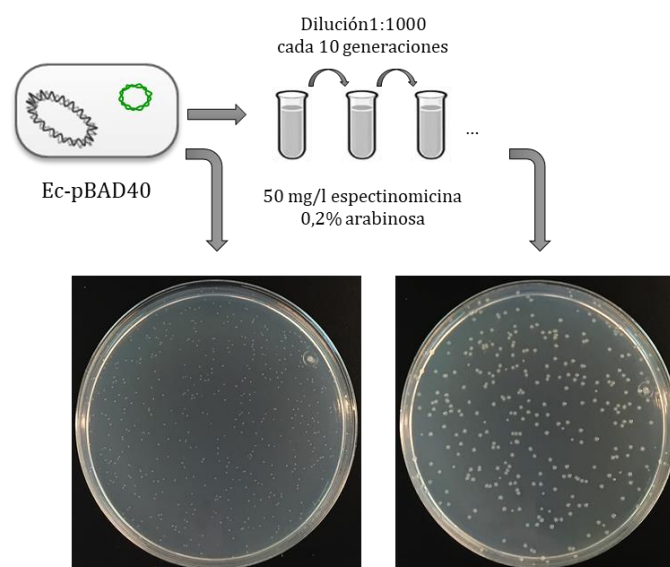


Figura 40. Recuperación del fenotipo WT de las colonias de Ec-pBAD40 tras su propagación en medio líquido en presencia de espectinomicina y arabinosa.

La recuperación de este fenotipo podía deberse a mutaciones en el cromosoma de *E. coli* o a mutaciones en el plásmido pBAD-40, por lo que seleccionamos 100 de estos mutantes y analizamos su secuencia plasmídica mediante PCR y secuenciación, en búsqueda de colonias con fenotipo WT en las que no existieran mutaciones en el plásmido. Esto podría sugerir que el fenotipo normal se habría recuperado gracias a mutaciones cromosómicas compensatorias, permitiendo la adaptación de la bacteria al plásmido.

Sin embargo, en las 100 colonias que analizamos, la PCR mostró un fragmento de ADN más grande del esperado, y al secuenciar varias de ellas, comprobamos que en todos los casos

una secuencia de inserción, la IS5, se había insertado en pBAD-40 desde el cromosoma de *E. coli*, interrumpiendo el ORF40 en el nt 85, justo entre las dos posiciones donde se insertaron la IS1 y la IS10 en pB1000 (Figura 41).

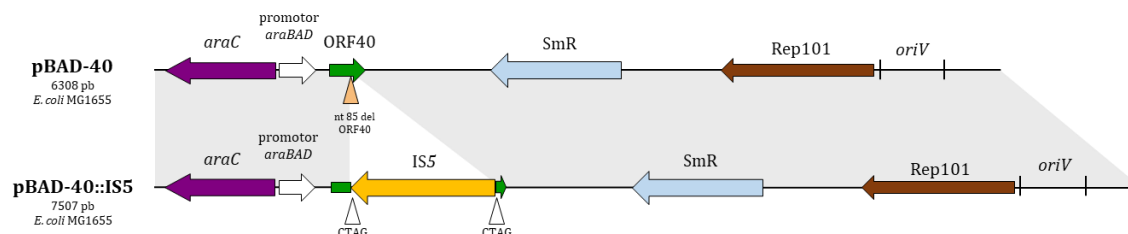


Figura 41. Estructura genética de pBAD-40 y pBAD-40::IS5. Las sombras grises indican la similitud entre los dos plásmidos. El triángulo amarillo indica la posición del ORF40 donde la IS5 se inserta, y los dos triángulos blancos indican la repetición directa producida al insertarse la IS. Los *oriV* de los plásmidos se indican con dos barras verticales.

Por tanto, en todas las bacterias evolucionadas analizadas la recuperación del fenotipo WT se debió a la interrupción del ORF40, impidiendo con ello su expresión y su efecto tóxico. En ningún caso encontramos bacterias en las que la secuencia del ORF40 se mantuviera intacta, por lo que descartamos esta aproximación para investigar el efecto a nivel genotípico del ORF40.

3.3.1.3. Aproximación (iii): obtención de un mutante espontáneo de Ec-V4

Como hemos comentado en el apartado 3.2.5., el mutante denominado Ec-V4 (portador de la construcción plasmídica V4GTC), el cual se construyó para averiguar el codón de inicio del ORF40, mostraba un fenotipo particular en medio con arabinosa al 0,2%. Este fenotipo consistía en una mayoría de colonias muy pequeñas (incluso más pequeñas que las originadas por Ec-pBAD40) y algunas colonias “mutantes” que presentaban un fenotipo anormalmente grande, en algunos casos más grandes que las colonias con fenotipo WT. Estas colonias mutantes, además, portaban el plásmido V4GTC, puesto que crecían en medio con espectinomicina y arabinosa, y conservaban su fenotipo mutado tras ser replicadas sucesivamente en ese mismo medio. Por ello, investigamos si en estas colonias existía

alguna mutación en el plásmido V4GTC, ya que, en caso negativo, podrían haber compensado la toxicidad del ORF40 mediante mutaciones cromosómicas.

De las 7 colonias que conservamos y analizamos mediante PCR, 4 de ellas presentaron la inserción de IS5 en la misma posición observada en las cepas de Ec-pBAD40, es decir, interrumpiendo el ORF40 en el nt 85. Sin embargo, las otras 3 colonias no presentaron ninguna modificación en el ORF40 con respecto a V4GTC. Por ello, consideramos que estas tres cepas, a las que denominamos Ec-V4.1, Ec-V4.2 y Ec-V4.3, eran posibles candidatas a presentar mutaciones cromosómicas que compensaran el efecto del ORF40 sobre el crecimiento de *E. coli*.

Para averiguar si el fenotipo observado en Ec-V4.1, Ec-V4.2 y Ec-V4.3 se debía a cambios cromosómicos o a mutaciones en alguna otra región del plásmido que pudieran afectar a la expresión del ORF40, extrajimos los plásmidos de estas cepas y los transformamos en *E. coli* MG1655, dando lugar a las cepas Ec-V4.1t, Ec-V4.2t y Ec-V4.3t. Una vez obtenidas todas las cepas, las sembramos en medio LB con arabinosa al 0,2% para inducir la expresión del ORF40. De esta forma, si el fenotipo mutante se mantenía, indicaría que el cambio fenotípico observado era debido al plásmido, mientras que si el fenotipo se revertía al original (el plásmido V4GTC daba lugar a muchas colonias muy pequeñas y algunas colonias mutantes), podría indicar que existía una mutación cromosómica responsable del cambio en el fenotipo.

Como se observa en la Figura 42, los transformantes Ec-V4.1t y Ec-V4.3t mantuvieron el mismo fenotipo mutante (de tamaño similar al WT) que las cepas Ec-V4.1 y Ec-V4.3. Posteriormente comprobamos mediante secuenciación que los plásmidos de estas cepas portaban mutaciones en el promotor del operón *araBAD*, lo que probablemente impedía la expresión del ORF40 y por tanto revertía su efecto tóxico.

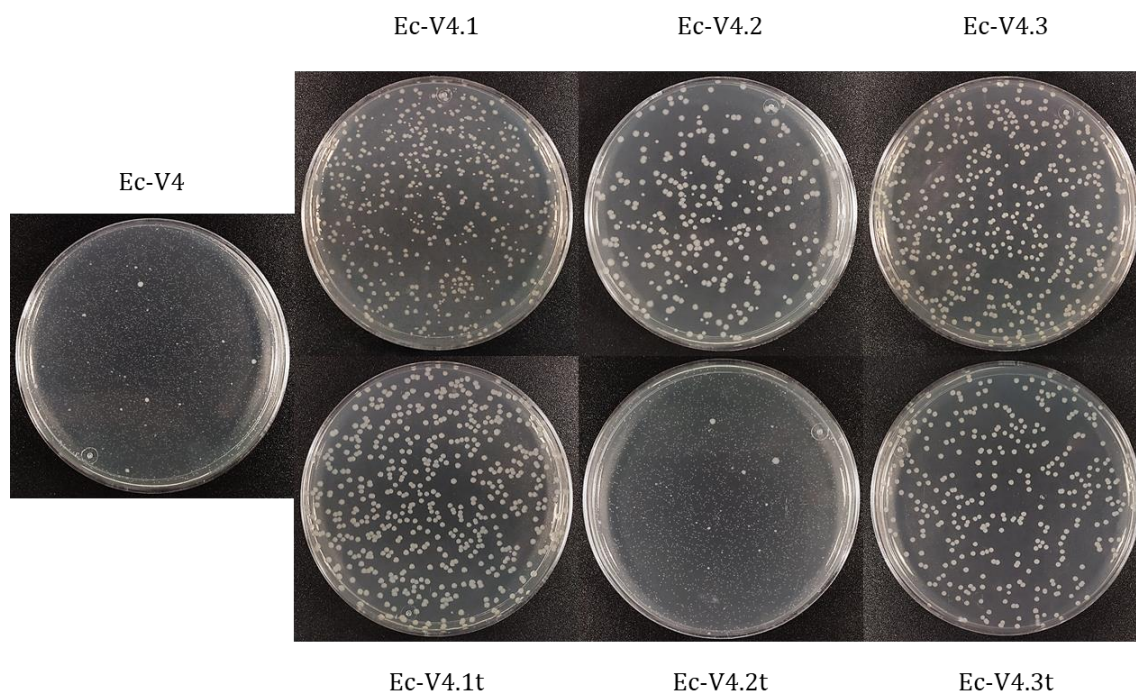


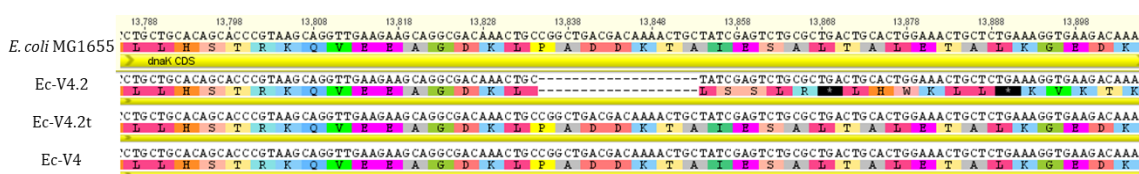
Figura 42. Fenotipo de las colonias generadas por las cepas Ec-V4, Ec-V4.1, Ec-V4.2 y Ec-V4.3, y de los transformantes Ec-V4.1t, Ec-V4.2t y Ec-V4.3t, obtenidos al transformar *E. coli* con los plásmidos de las anteriores. Todas las placas son de medio LB con arabinosa al 0,2% para inducir la expresión del ORF40. Todas las placas fueron sembradas con 100 μ l de las diluciones 10^{-3} o 10^{-4} de inóculos líquidos de cada cepa, y en todos los casos se incubaron a 37°C durante 16 horas.

En el caso del mutante Ec-V4.2, éste generó colonias con fenotipo mutante y una pequeña proporción de colonias con fenotipo más pequeño. Sin embargo, el transformante Ec-V4.2t recuperó el mismo fenotipo observado en Ec-V4, es decir, dio lugar a una mayoría de colonias muy pequeñas y a un pequeño número de colonias más grandes similares a las colonias WT. Esto implicaba que el plásmido de la cepa Ec-V4.2 no era el responsable de la reversión al fenotipo WT en esta cepa, puesto que el mismo plásmido al ser extraído y transformado de nuevo en *E. coli* MG1655 daba lugar a colonias con fenotipo alterado iguales a las de Ec-V4. Por tanto, esta cepa, Ec-V4.2, podría presentar alguna mutación en el cromosoma que impidiera o, al menos, disminuyera el efecto tóxico del ORF40 sobre *E. coli*.

3.3.2. Secuenciación del mutante fenotípico Ec-V4.2

Analizamos el genoma de la cepa Ec-V4.2 combinando las técnicas de Illumina y Nanopore (ver Materiales y Métodos), y una vez ensamblado, lo comparamos con los genomas de las cepas Ec-V4 y Ec-V4.2t, las cuales fueron secuenciadas con las mismas técnicas, para analizar si existían modificaciones genéticas entre las tres cepas que pudieran ser responsables de las diferencias fenotípicas observadas.

Como era esperable, los plásmidos de las tres cepas fueron idénticos, con el genotipo del plásmido V4GTC. En cuanto al cromosoma de *E. coli*, el único gen con diferencias entre las tres cepas fue el gen *dnaK* (número de acceso en GenBank: NC_000913.3 (12163..14079)), que expresa la proteína DnaK. Mientras que las cepas Ec-V4 y Ec-V4.2t no presentaron ninguna mutación en dicho gen en comparación con el gen de referencia en las bases de datos, el gen *dnaK* de la cepa Ec-V4.2 presentó una delección de 19 pb entre los nucleótidos 1666 y 1684 del gen, que originalmente tiene 1917 nucleótidos (Figura 43), la cual corroboramos mediante secuenciación Sanger. Esta delección modificó la secuencia aminoacídica de la proteína DnaK desde su aminoácido 558 (de un total de 638 aa) y modificó el marco de lectura, generando un codón de parada tras el aa 563.



La proteína DnaK es una proteína chaperona perteneciente a la familia Hsp70, cuyas principales funciones están relacionadas con el plegamiento correcto de proteínas de nueva síntesis y de proteínas cuya estructura ha sido alterada en respuesta a situaciones de estrés celular (Aguilar-Rodriguez *et al.*, 2016).

Por tanto, el hecho de que la única diferencia genotípica entre las tres cepas consista en una delección en el gen *dnaK*, sumado al rol de DnaK en respuesta a situaciones de estrés celular, podría indicar que la proteína DnaK está implicada en la reversión al fenotipo WT de la cepa Ec-V4.2.

3.3.3. Efecto de la mutación de *dnaK* sobre la toxicidad generada por el ORF40

Para investigar si la mutación observada en el gen *dnaK*, que modifica y trunca la proteína DnaK desde su aminoácido 558, podría estar relacionada con la toxicidad generada por el ORF40 en *E. coli* y con la recuperación del fenotipo WT de las colonias de Ec-V4.2, analizamos en primer lugar la estabilidad del plásmido V4GTC en la cepa Ec-V4.2, con la finalidad de averiguar si la mutación de *dnaK* permitía la estabilización del vector en esta cepa.

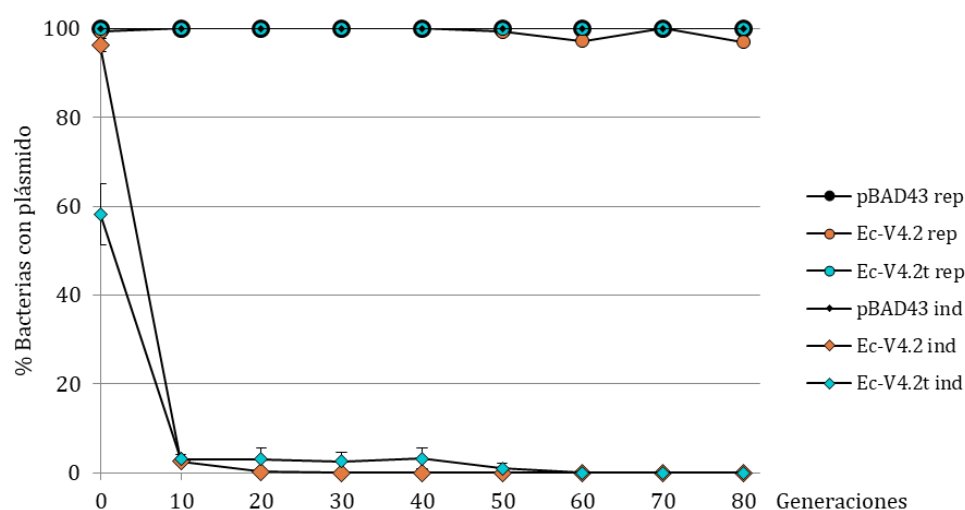


Figura 44. Estabilidad del plásmido V4GTC en las cepas Ec-V4.2 (portadora de la mutación en *dnaK*) y Ec-V4.2t, en condiciones de represión (rep) e inducción (ind) de la expresión del ORF40. En la gráfica también se muestra la estabilidad de pBAD43 en *E. coli* (control). Todos los valores son la media de entre 3 y 6 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.

Como se observa en la Figura 44, el plásmido V4GTC fue inestable en la cepa Ec-V4.2, portadora del gen *dnaK* mutado, al igual que en el transformante Ec-V4.2t, ya que ambos plásmidos se perdieron rápidamente en las poblaciones al inducir la expresión del ORF40,

mientras que se mantuvieron estables en las poblaciones analizadas en presencia de glucosa.

No obstante, la reversión al fenotipo WT de la cepa Ec-V4.2, cuya única diferencia genotípica con respecto a Ec-V4 era la mutación en *dnaK*, sugería que esta mutación estaba implicada en una mejora del crecimiento bacteriano, es decir, un incremento en el *fitness* de esta cepa. Para comprobarlo, realizamos curvas de crecimiento durante 8 horas de esta cepa bajo condiciones de represión e inducción del ORF40, así como de las cepas Ec-V4 y Ec-V4.2t (Figura 45).

Con estas curvas de crecimiento pudimos observar que las cepas Ec-V4 y Ec-V4.2t crecieron a una velocidad inferior al inducir la expresión del ORF40, y tras 8 horas la densidad óptica alcanzada fue menor que la de las poblaciones crecidas en glucosa, mostrando, al igual que veíamos con pB1000, una disminución del *fitness* bacteriano debida a la expresión del ORF40.

Por el contrario, la cepa Ec-V4.2, portadora de la mutación en *dnaK*, creció de forma muy similar tanto en condiciones de represión como de inducción del ORF40, alcanzando la misma densidad óptica en ambos medios a las 8 horas. Este resultado podría indicar que, pese a que la mutación en *dnaK* no impide la pérdida del plásmido en la población, sí produce un incremento del *fitness* bacteriano, como ya se intuyó al observar el crecimiento de colonias con fenotipo WT en esta cepa. Este resultado será discutido en el siguiente apartado de esta Tesis Doctoral.

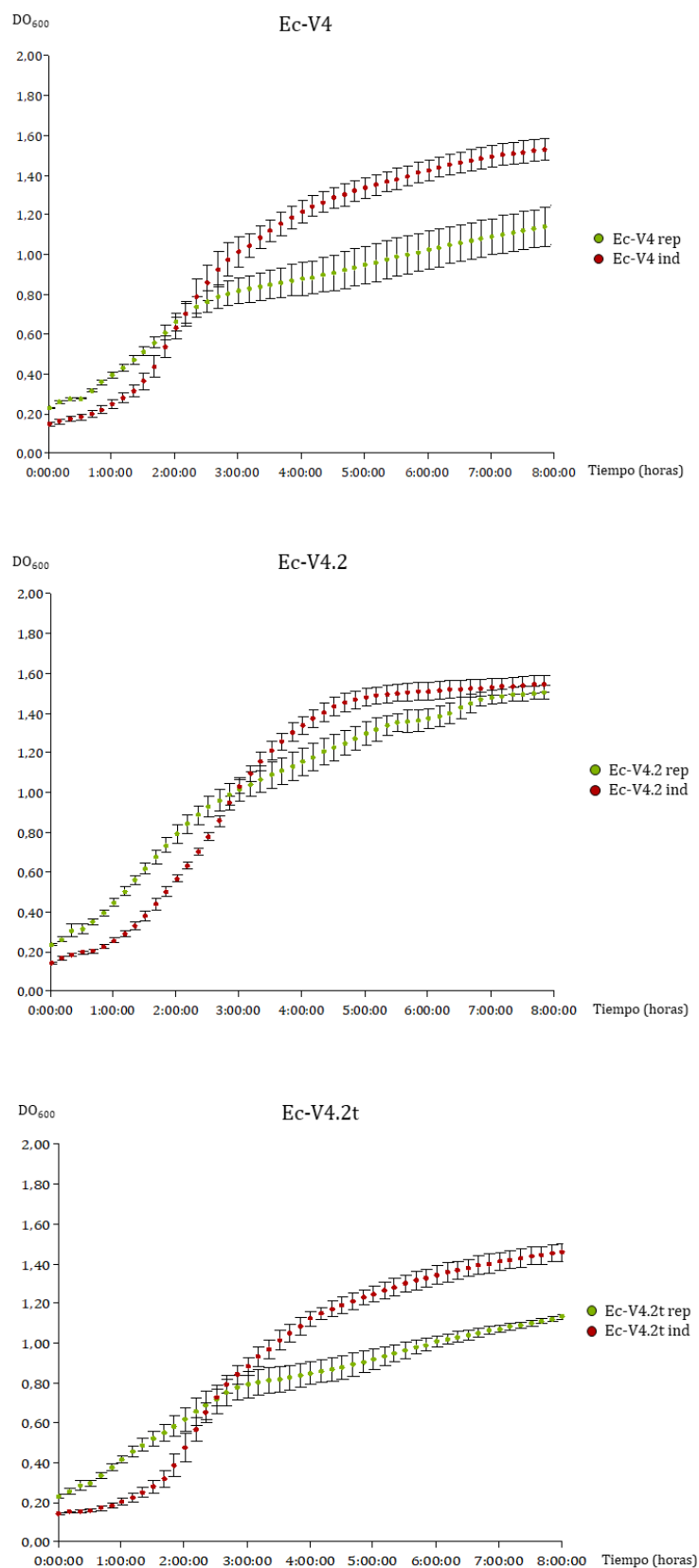


Figura 45. Curvas de crecimiento de las cepas Ec-V4, Ec-V4.2 y Ec-V4.2t en condiciones de represión (rep) e inducción (ind) de la expresión del ORF40. Todos los valores son la media de 6 mediciones, con el error estándar (EE) indicado con barras verticales.



DISCUSIÓN

1. LA ADAPTACIÓN DE pB1000 A UN NUEVO HOSPEDADOR ESTÁ MEDIADA POR SECUENCIAS DE INSERCIÓN Y SNPs EN EL *oriV*

1.1. El modelo pB1000 en *E. coli*

La grave crisis de resistencia a antibióticos a la que nos enfrentamos hace necesario el estudio y caracterización de los mecanismos involucrados en la diseminación de las resistencias para encontrar mecanismos eficaces que ayuden a frenar su avance. Dado el relevante papel de los plásmidos en la dispersión de los genes de resistencia, en los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones con el fin de comprender la elevada persistencia de los plásmidos y su alta capacidad de diseminación entre distintas poblaciones bacterianas (Bergstrom *et al.*, 2000; De Gelder *et al.*, 2007; Cottell *et al.*, 2012; San Millan *et al.*, 2014b; Stalder *et al.*, 2017; Carroll & Wong, 2018). En muchos casos se ha visto que los plásmidos son capaces de persistir al ser adquiridos por nuevos hospedadores gracias a la compensación de su coste biológico al coevolucionar junto con su hospedador (Tabla 1). Muchos de estos trabajos, no obstante, no llegan a esclarecer los mecanismos adaptativos ocurridos durante la compensación, y la gran mayoría de los estudios que sí han caracterizado dichos mecanismos se han llevado a cabo principalmente con plásmidos grandes conjugativos, produciéndose fenómenos adaptativos que pueden tener poca relación con los plásmidos pequeños multicopia (Turner *et al.*, 1998; Dahlberg & Chao, 2003; Dionisio *et al.*, 2005; De Gelder *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2015; Porse *et al.*, 2016).

Esta situación hizo que nuestra elección para estudiar la adaptación de plásmidos pequeños a nuevas especies bacterianas fuera el plásmido pB1000, por varias razones. En primer lugar, pB1000 es un plásmido tipo ColE1 multicopia que ha sido descrito en varias especies patógenas tanto de seres humanos como de animales (San Millan *et al.*, 2007; San Millan *et al.*, 2009; San Millan *et al.*, 2010; Gangaiah *et al.*, 2016), donde produce elevados niveles de resistencia a β -lactámicos, uno de los grupos de antibióticos más utilizados en la práctica

clínica (Bush & Bradford, 2016). En segundo lugar, en trabajos anteriores hemos descrito la capacidad de pB1000 de compensar su coste biológico al evolucionar en su hospedador natural *H. influenzae*, donde es capaz de modular su PCN tanto en presencia como en ausencia de presión selectiva (San Millan *et al.*, 2015a; Santos-Lopez *et al.*, 2017a). Por último, pese a ser capaz de replicar en otras familias, pB1000 tan solo ha sido descrito en la naturaleza en especies de la familia *Pasteurellaceae*, en las cuales es mantenido de manera estable (San Millan *et al.*, 2009; Santos-Lopez *et al.*, 2017a). Esto parece indicar un alto grado de adaptación a esta familia y una especificidad en cuanto a su rango de hospedador. Todo esto nos llevó a investigar la capacidad de adaptación de pB1000 a nuevas familias bacterianas, tomando como modelo la especie *E. coli*, en la cual habíamos visto previamente que, pese a ser capaz de replicar, se perdía en pocas generaciones.

1.2. La coevolución plásmido-hospedador estabiliza pB1000 en *E. coli*

Numerosos trabajos reflejan la estabilización de plásmidos en nuevos hospedadores mediante evolución adaptativa (Tabla 1), tanto en presencia (Bouma & Lenski, 1988; San Millan *et al.*, 2014b; Harrison *et al.*, 2015; Porse *et al.*, 2016) como en ausencia (Modi & Adams, 1991; Modi *et al.*, 1991; Dahlberg & Chao, 2003) de presión selectiva. Para averiguar si pB1000 era capaz de adaptarse a esta nueva especie bacteriana, llevamos a cabo evoluciones experimentales durante 500 generaciones, obteniendo muestras de la población cada 5 días (aproximadamente 50 generaciones). De esta forma, podríamos evaluar la aparición y la dinámica de fenómenos adaptativos tanto a corto plazo como a largo plazo. En nuestro caso, realizamos las evoluciones con presión antibiótica debido a la alta inestabilidad de pB1000, pues en ausencia de antibiótico que seleccionara a las bacterias portadoras de plásmido, éste se perdía rápidamente.

Una vez finalizadas las evoluciones, analizamos la estabilidad de los plásmidos en las poblaciones evolucionadas durante 500 generaciones. Pese a que pB1000 en *E. coli* es

inicialmente muy inestable, tras coevolucionar con este hospedador todas las poblaciones mantuvieron el plásmido de forma estable durante al menos 100 generaciones en ausencia de antibiótico. Esto demuestra que pB1000 es capaz de adaptarse a nuevos hospedadores tras un periodo de exposición antibiótica, lo que conllevaría la diseminación de ROB-1, la β -lactamasa que porta, en una familia bacteriana en la que nunca se ha descrito. En trabajos previos ya habíamos descrito la plasticidad de pB1000 para adaptarse a su hospedador natural *H. influenzae*, donde es capaz de regular su PCN y *fitness cost* mediante ensayos evolutivos (San Millan *et al.*, 2015a; Santos-Lopez *et al.*, 2017a; Santos-Lopez *et al.*, 2017b). En este trabajo hemos descrito por primera vez su capacidad de diseminación y estabilización en nuevas familias bacterianas, lo que ayuda a explicar la elevada prevalencia de los plásmidos en ambientes donde las comunidades bacterianas están expuestas a los antibióticos.

1.3. La adquisición de ISS cromosómicas y los SNPs en el *oriV* estabilizan pB1000 en su nuevo hospedador

Cuando la coevolución plásmido-hospedador da lugar a una adaptación entre ambos, los mecanismos involucrados en dicha adaptación pueden ocurrir tanto en el cromosoma bacteriano como en el plásmido evolucionado (Harrison & Brockhurst, 2012). Por ello, en primer lugar extrajimos y secuenciamos los plásmidos evolucionados en las nueve poblaciones, para averiguar si se habían producido mutaciones en sus secuencias durante los ensayos evolutivos. En los nueve plásmidos recuperados tras 500 generaciones de evolución encontramos dos tipos de modificaciones genéticas: la aparición de un SNP en el origen de replicación putativo de pB1000 y la transposición de una secuencia de inserción desde el cromosoma de *E. coli* (Figura 22). Además, al secuenciar los plásmidos extraídos de las evoluciones cada 50 generaciones, pudimos analizar el momento en que dichas mutaciones aparecían, su dinámica y su persistencia en las poblaciones plasmídicas. Como

pudimos comprobar con los experimentos posteriores, ambos tipos de mutación demostraron ser claves para la adaptación de pB1000 a *E. coli*, aunque por diferentes mecanismos.

➤ Secuencias de inserción:

En seis de las líneas evolutivas los plásmidos adquirieron la IS1A (IS1; número de acceso en GenBank: X52534), mientras que en las otras tres evoluciones fue la IS10R (IS10; número de acceso en GenBank: AH003348) la que se insertó en pB1000.

Ambas ISs son elementos móviles comunes en los genomas bacterianos, y en particular en el genoma de *E. coli*, donde en distintas cepas se han contabilizado una media de 6-8 copias de IS1 (Sawyer *et al.*, 1987) y 2-4 copias de IS10 (Matsutani, 1991). En concreto, en la cepa de laboratorio *E. coli* DH5 α , en la que realizamos los ensayos evolutivos, ambas ISs cuentan con 5 copias cromosómicas cada una (número de acceso en GenBank: NZ_JRYM000000000), aunque debido a la naturaleza transpositiva de estos elementos, el número de copias en nuestra cepa de laboratorio podría ser variable. Los ratios de transposición (por copia y por generación) de ambas ISs también han sido caracterizados previamente, siendo de $2,67 \times 10^{-5}$ (Sousa *et al.*, 2013) y de 1×10^{-4} (Shen *et al.*, 1987) para IS1 e IS10 respectivamente.

En la literatura encontramos que gran parte de las secuencias de inserción descritas poseen un sitio diana preferente para su transposición (Mahillon & Chandler, 1998). En el caso de IS1, pese a no tener una diana de inserción definida, muestra preferencia por regiones ricas en AT (Meyer *et al.*, 1980), como es el caso de la región de pB1000 donde se inserta. En cuanto a IS10, ésta tiene preferencia por una secuencia simétrica de 9 pb, NGCTNAGCN (Kleckner *et al.*, 1996), que coincide con la repetición directa generada al insertarse en pB1000 excepto por un nucleótido.

En cualquier caso, un resultado particularmente llamativo en cuanto a la presencia de ISs en los plásmidos evolucionados fue la inserción de ambas ISs en la misma región del plásmido en todas las poblaciones, con únicamente dos nucleótidos de diferencia entre ellas. Además, al secuenciar los plásmidos cada 50 generaciones, pudimos comprobar que en todas las líneas evolutivas la gran mayoría de plásmidos presentes en las poblaciones adquirieron una IS durante las primeras generaciones. Teniendo en cuenta el elevado número de bacterias presentes en la población y la tasa de transposición de ambas ISs, la aparición de estos genotipos plasmídicos en todas las líneas evolutivas implica un alto grado de selección positiva de los plásmidos que adquieren una secuencia de inserción en esta región durante los ensayos evolutivos.

Todo esto ya sugería que la adquisición de secuencias de inserción en esta región concreta de pB1000 podía tener un papel fundamental en la adaptación entre pB1000 y *E. coli*, lo cual confirmamos con los experimentos posteriores.

➤ SNP en el origen de replicación:

Todos los plásmidos obtenidos tras 500 generaciones de evolución portaron, además de una IS, un único SNP en el *oriV*. Al igual que ocurría con la adquisición de ISs, la constante aparición de SNPs en el *oriV* reveló un proceso de evolución paralela en las distintas poblaciones, ya que pudimos observar los mismos cambios genéticos en líneas evolutivas independientes, sugiriendo que ambos cambios jugaban un papel importante en el proceso de adaptación entre plásmido y bacteria. Además, dos de los SNPs presentes en los plásmidos evolucionados durante 500 generaciones, T3874A y T3819A, aparecieron en más de una población. Dado que el ratio de mutación por genoma y por generación bacteriana en *E. coli* es aproximadamente de 10^{-3} (Lee *et al.*, 2012) – que, en el caso de *E. coli*, supondría una mutación cada $4,2 \times 10^{-9}$ pb por generación –, en un experimento evolutivo en el que realizamos diluciones seriadas

esperaríamos encontrar únicamente aquellas mutaciones que confieran una ventaja adaptativa con respecto al genotipo WT, ya que el resto de mutaciones que aparezcan durante la evolución quedarán diluidas en la población (Cooper, 2018). Por tanto, al igual que ocurría con la inserción de ISs, la aparición de estos SNPs en el *oriV* de los plásmidos evolucionados muestra una clara selección positiva de estos genotipos sobre el resto.

Al analizar la frecuencia y dinámica de aparición de estos SNPs desde el comienzo de las evoluciones, observamos un patrón de interferencia clonal en varias de las poblaciones. Una de las poblaciones que mejor ilustra este tipo de patrón evolutivo es la población 7 (Figura 24). En ella se observa cómo durante las primeras generaciones aparecen tres mutaciones diferentes en el *oriV* de los plásmidos, que, a pesar de conferir una ventaja adaptativa a las bacterias que los portan – observado por el aumento de frecuencia de dichos alelos en los plásmidos – no son capaces de fijarse en la población bacteriana debido a la interferencia clonal, y coexisten junto con el alelo ancestral durante cierto periodo. Aunque cada una de estas mutaciones resulte beneficiosa, durante este periodo los distintos genotipos compiten entre ellos, y ninguno consigue dominar sobre el resto. Esto se mantiene hasta la generación 200, momento en el que la mutación T3874A aparece, y debido a la mayor ventaja de este alelo, durante las siguientes generaciones consigue fijarse en el 100% de la población plasmídica, provocando que el resto de las mutaciones desaparezcan. Esto implica que dicho genotipo es el que confiere una mayor ventaja adaptativa a los plásmidos y que, al estar sometidos a una fuerte presión selectiva, consigue imponerse sobre el resto y perdurar en la población.

Las mutaciones encontradas en los plásmidos evolucionados sugerían que dichos cambios podrían ser determinantes en la adaptación entre pB1000 y su nuevo hospedador. Para confirmarlo, y además para poder saber la importancia de cada mutación (IS/SNP) de manera independiente, seleccionamos plásmidos portadores de una IS (IS1/IS10), del SNP

T3874A y de la combinación de ambos, y analizamos su estabilidad en el hospedador sin evolucionar. Este análisis confirmó que ambas mutaciones eran responsables de la adaptación entre plásmido y hospedador, es decir, que el periodo de coevolución había derivado en la adaptación de pB1000 a *E. coli* y había permitido la estabilización de pB1000 en este nuevo hospedador.

El análisis de estabilidad de los plásmidos portadores de un único cambio genético (solamente una IS o solamente el SNP) reveló que ambas mutaciones producían un incremento de la estabilidad de los plásmidos similar, pero que ninguna de ellas individualmente conseguía estabilizar completamente al plásmido. Al analizar de nuevo la dinámica de adquisición de las mutaciones plasmídicas a lo largo de las evoluciones, vimos que en todos los casos salvo uno (población 9) las ISs estaban presentes en prácticamente la totalidad de los plásmidos en la generación 50, mientras que la aparición de SNPs en el *oriV* fue algo más variable, pues hubo poblaciones en las que, pese a coexistir varios SNPs durante un periodo, hasta la generación 300 no se fijaba el SNP definitivo en la población. Dado que la tasa de transposición de ambas ISs (10^{-4} - 10^{-5} /generación) es muy superior a la tasa de mutación nucleotídica (10^{-9} /generación), es más probable que, siendo ambos mecanismos seleccionados durante la evolución, la transposición de ISs se produzca antes que la aparición de SNPs. Por tanto, esta primera inserción de ISs en los plásmidos podría dar lugar a una primera fase de adaptación plasmídica que, pese a no estabilizar completamente a los plásmidos, permitiría su mantenimiento durante un periodo debido a la reducción de su coste biológico (Figura 28), dando tiempo a que las mutaciones del *oriV* más beneficiosas puedan estabilizarse en la población y dar lugar finalmente a los plásmidos mejor adaptados, que quedan fijados y permanecen en la población final.

Ambos eventos, la inserción de ISs y las mutaciones en el *oriV*, están altamente seleccionados en las evoluciones independientemente del orden en el que ocurran, y esto podemos observarlo en la población 9 (Figura 24). En esta población la IS10 es adquirida

únicamente por una pequeña parte de los plásmidos, y la mayoría de ellos únicamente portan el SNP T3894C. Sería interesante conocer con exactitud las regiones codificantes de los ARNs responsables de la replicación de pB1000, ya que si dicho SNP es capaz de permitir la adaptación de pB1000 a *E. coli* aun en ausencia de ISSs, es probable que se encuentre en una posición clave para la interacción entre ambos ARNs. Uno de los próximos proyectos de nuestro grupo será el análisis transcriptómico de pB1000, lo que nos permitirá conocer la posición exacta de éste y del resto de SNPs aparecidos durante las evoluciones adaptativas.

1.4. La modulación del PCN y la reducción del fitness cost facilitan la adaptación plasmídica

Como hemos visto en la introducción de esta Tesis Doctoral, los plásmidos ColE1 carecen de sistemas de partición activa que ayuden a estabilizarlos en la población bacteriana, sino que su elevado número de copias suele ser suficiente para que las células hijas hereden al menos una copia plasmídica durante la división celular (Summers, 1998). Por ello, analizamos el PCN de los plásmidos portadores de ISSs y/o SNP, preguntándonos si un aumento del número de copias podía tener relación con la estabilidad observada.

Los resultados, mostrados en la Figura 26, fueron bastante sorprendentes. Para empezar, fue llamativo el bajo PCN del plásmido pB1000 original, pues tan solo contaba con 1,7 copias de media por cromosoma, número muy por debajo de las 44 copias/bacteria que porta su hospedador natural *H. influenzae* (San Millan *et al.*, 2015a). Es muy probable que la replicación de pB1000, altamente adaptada a la familia *Pasteurellaceae*, sea ineficiente en *E. coli*, lo cual puede ser debido a múltiples factores relacionados con el hospedador, como la modificación de las proteínas implicadas en la replicación o una mayor interferencia con ARNs (Baltrus, 2013). Todo esto, junto con su elevado coste biológico (Figura 28), podría explicar la alta inestabilidad de pB1000 en este hospedador.

Los plásmidos que únicamente adquirieron una IS, pese a haber mostrado un incremento de estabilidad, no aumentaron su PCN, sino que éste fue igual de reducido que el de pB1000 (Figura 26). Sin embargo, los tres plásmidos que tenían un SNP en el *oriV* incrementaron muy significativamente el PCN, llegando a ser de hasta 45 copias por cromosoma. De nuevo, será interesante poder conocer con exactitud la posición de este SNP en los componentes implicados en la replicación de pB1000. Algunas de las principales hipótesis que explicarían este aumento del PCN podrían ser un aumento del ARNII en relación con el ARNI, en caso de que la mutación altere la fuerza de los promotores P1 o P2, o una disminución de la afinidad entre ambos ARNs en la formación del *kissing complex*, que disminuiría la inhibición de la replicación ejercida por el ARNI (Wang *et al.*, 2004). Existe una limitación a la hora de caracterizar la función de esta mutación y del resto de SNPs en el *oriV* aparecidos durante los ensayos evolutivos. El origen de replicación del plásmido ColE1, utilizado como modelo en este grupo de plásmidos, está descrito detalladamente (Camps, 2010). No obstante, en la familia *Pasteurellaceae* únicamente se ha descrito la región mínima necesaria para la replicación plasmídica (Dixon *et al.*, 1994), basándose en la homología estructural con los ColE1 de *Enterobacteriaceae*. Por tanto, de nuevo, sería interesante caracterizar el *oriV* de pB1000 para conocer con exactitud la posición de los SNPs en los componentes implicados en su replicación, y detallar el papel de dichas mutaciones.

En cualquier caso, el aumento del PCN de estos tres plásmidos podría explicar por qué son más estables que pB1000 ancestral. Sin embargo, el plásmido pB1000.SNP, que no porta ninguna IS en su secuencia, pese a tener el mayor número de copias, es el más inestable de los tres (de hecho, los dos plásmidos que portan IS+SNP se mantienen completamente estables). Esto indicaría que la adquisición de ISs cromosómicas permite la adaptación de pB1000 a *E. coli* mediante otro mecanismo diferente al aumento del PCN, el cual, como comprobamos al analizar el *fitness* bacteriano, está relacionado con una reducción del coste biológico de los replicones.

El patrón que siguió el nivel de resistencia conferido por los distintos plásmidos fue similar al del PCN, incrementando significativamente en presencia del SNP en el *oriV*. El plásmido pB1000 porta la β -lactamasa ROB1, responsable del fenotipo de resistencia conferido. El aumento de β -lactamasa liberada al medio, producido por un aumento del PCN, es probablemente responsable de este incremento de la CMI, como hemos descrito en trabajos previos (San Millan *et al.*, 2015a; Santos-Lopez *et al.*, 2017a). De hecho, observamos una correlación lineal positiva entre el aumento del PCN y el aumento de la CMI, corroborando la relación entre ambos factores.

Aparte del PCN, la estabilidad de los plásmidos multicopia está muy influenciada por el coste biológico que imponen a sus hospedadores (Santos-Lopez *et al.*, 2017a), de hecho, en la introducción hemos visto cómo en muchas ocasiones la evolución compensatoria actúa reduciendo este *fitness cost* para facilitar la adaptación entre plásmido y hospedador (Tabla 1). Al analizar el coste biológico de los plásmidos que habían adquirido ISs durante los ensayos evolutivos, comprobamos que, efectivamente, dicho coste era hasta 3 veces menor en pB1000::IS1 y pB1000::IS10 que en el plásmido original (Figura 28).

Analizando la bibliografía disponible, en ningún caso hemos encontrado descripciones de compensación del coste biológico de un plásmido a través de la adquisición de secuencias de inserción. En algunos casos se ha descrito su importancia evolutiva al movilizarse y delecionar fragmentos plasmídicos costosos para la bacteria portadora (Porse *et al.*, 2016), sin embargo, en nuestro caso es su inserción la que parece reducir el coste de pB1000, por lo que decidimos investigar en profundidad el mecanismo por el que su inserción reducía el coste biológico de pB1000.

Ambas ISs fueron adquiridas en todos los casos en la misma región de pB1000, una secuencia intergénica localizada corriente arriba de *bla*_{ROB-1} en la que no estaba descrita la presencia de ningún ORF ni otro tipo de estructura genética. Una de las primeras hipótesis que barajamos fue que la reducción del coste biológico podría deberse a cambios en la

expresión del gen *bla*_{ROB-1} debidos a la alteración de su ARNm o a la acción de promotores codificados en las ISs, lo cual está descrito en la literatura (Vandecraen *et al.*, 2017). Sin embargo, los niveles de resistencia no aumentaron en las cepas portadoras de pB1000::IS1 y pB1000::IS10 con respecto al plásmido ancestral (Figura 26), por lo que descartamos esta hipótesis.

Otra posibilidad era que la adquisición de ISs en la misma región podría estar relacionada con la interrupción de algún elemento genético, como un ORF o un ARN, de pB1000 que, al ser interrumpido, facilitara la adaptación del plásmido a *E. coli*. El análisis de las construcciones *mock* y de pB1000.2310A confirmó esta hipótesis (Figuras 30 y 31), pues las tres variantes de pB1000 se comportaron exactamente igual que los plásmidos con secuencias de inserción.

Por tanto, esto sugeriría la presencia de una estructura en pB1000, no descrita previamente, que era responsable, al menos parcialmente, del elevado coste biológico de pB1000 en su nuevo hospedador, provocando la rápida pérdida del plásmido en ausencia de presión selectiva, y probablemente fuera la causa de la menor estabilidad observada con pB1000.SNP en comparación con los plásmidos pB1000.SNP::IS1 y pB1000.SNP::IS10, pese a tener un PCN más elevado. La coevolución de plásmido/hospedador ejerciendo una presión selectiva sobre el plásmido derivó en la interrupción de dicha secuencia gracias a la movilización e inserción de ISs cromosómicas, lo cual refleja el importante papel de los elementos móviles en la evolución y la plasticidad de los genomas.

1.5. Las secuencias de inserción expanden el rango de hospedador de pB1000

El rango de hospedador de los plásmidos está determinado por las especies bacterianas en las que éstos puede replicar y ser mantenidos (del Solar *et al.*, 1996). En experimentos de evolución adaptativa se han descrito tanto expansiones (Maestro *et al.*, 2003) como cambios en el rango de hospedador de los plásmidos (De Gelder *et al.*, 2007), que además pueden

suponer una modificación de este rango a corto plazo o incluso a largo plazo, en los casos en los que los plásmidos persisten de manera estable en la nueva especie (De Gelder *et al.*, 2008).

La adquisición de secuencias de inserción y de SNPs en el *oriV* de pB1000 durante las evoluciones compensatorias en *E. coli* determinaron su adaptación a este nuevo hospedador. Sin embargo, el efecto sobre el rango de hospedador que estas dos modificaciones genéticas produjeron fue diferente:

- Los plásmidos con el SNP T3874A fueron incapaces de replicar en su hospedador natural *H. influenzae*, pese a que el plásmido original era 100% estable. Resulta llamativo que tan solo un SNP pueda alterar el mecanismo de replicación plasmídico hasta el punto de anularlo por completo. En un estudio previo que realizamos ya observamos cómo dos variantes de pB1000 diferenciadas únicamente por un polimorfismo en el nt 3880 eran capaces de cohabitar y regular de manera independiente su número de copias (Santos-Lopez *et al.*, 2017a). Ambos casos ejemplifican los finos niveles de regulación que puede alcanzar la replicación de los plásmidos, y, en el caso del SNP T3874A, cómo las fuerzas evolutivas permiten a un plásmido adaptarse a nuevas especies o familias bacterianas a costa de sacrificar su capacidad replicativa en su hospedador natural.
- Los plásmidos portadores de la IS1 en su secuencia, al contrario, sí que fueron capaces de replicar en su antiguo hospedador. También obtuvimos transformantes en *H. influenzae* de las construcciones *mock* una vez sustituidos los sitios diana de la enzima HincII, así como del plásmido con adición de una adenina en el nt 2310. Aunque no obtuvimos células transformantes al sustituir la diana presente en la secuencia de la IS10, nuestra hipótesis es que estos plásmidos también son capaces de replicar en su hospedador natural, pues tanto IS1 como IS10 han sido descritas en *Pasteurellaceae* (números de acceso en GenBank: AE017143 para IS1, y CP038873 para IS10). De hecho,

los plásmidos pB1000::IS1, pB1000.2310A y las dos construcciones *mock'* se mantuvieron de manera estable en *H. influenzae* durante al menos 100 generaciones. Esto implica, en primer lugar, que, al igual que hemos visto cómo la interrupción del ORF40 gracias a la inserción de ISs cromosómicas tiene un papel fundamental en su adaptación a *E. coli*, no afecta a la estabilidad del plásmido en su hospedador natural. En segundo lugar, al menos en el caso de la IS1, la adquisición de secuencias de inserción no afecta a la replicación ni a la estabilidad de pB1000 en su antiguo hospedador, mientras que facilita su adaptación a una nueva especie bacteriana. Se trata, por tanto, de una nueva estrategia evolutiva, en la que la adquisición de estos elementos móviles permite la expansión del rango de hospedador de un plásmido, y facilita su diseminación en una nueva familia bacteriana.

2. LA EXPRESIÓN DEL ORF40 DE pB1000 Y SU TOXICIDAD SOBRE *E. COLI*

2.1. La región interrumpida por las ISs es específica de plásmidos *ColE1* de *Pasteurellaceae*

Una vez que establecimos la importancia de la región de pB1000 donde se insertaron las ISs, realizamos un análisis *in silico* de dicha región. En primer lugar, quisimos determinar la existencia de ORFs que pudieran traducirse y producir alguna proteína responsable de la inestabilidad de pB1000. Encontramos un total de 3 ORFs de al menos 75 nt de longitud cuya traducción se impedía en los plásmidos con una IS (Figura 32). Los tres ORFs, denominados por su numeración en el buscador utilizado, fueron: ORF40 (42 aa), ORF3 (33 aa) y ORF65 (25 aa). Aunque los tres ORFs darían lugar a proteínas de tamaño muy inferior al tamaño de proteína medio – 278 aa para *E. coli* y 262 aa para *H. influenzae* (Brocchieri & Karlin, 2005) – podría tratarse de pequeños péptidos que generan un efecto tóxico en el nuevo hospedador. En cuanto a la búsqueda de promotores, tanto en la hebra positiva como en la negativa encontramos promotores que podrían iniciar la transcripción de los ORFs (dato no mostrado). En conjunto, estos resultados confirmaron que en esta región podría estar produciéndose un péptido que indujera la inestabilidad del plásmido en *E. coli*, y que al ser interrumpido por las secuencias de inserción, permitió la estabilización de pB1000 en este hospedador.

Por otro lado, al comparar la región que abarcaba estos ORFs con las bases de datos, comprobamos que únicamente se encontraba en plásmidos pequeños descritos en la familia *Pasteurellaceae*, lo que nos indujo a pensar que, en caso de producirse algún péptido en esta región, dicho péptido también podría resultar tóxico para otras especies situadas fuera de la familia *Pasteurellaceae*, pudiendo tratarse de pequeñas bacteriocinas de amplio espectro producidas exclusivamente en esta familia.

2.2. La expresión del ORF40 induce un efecto tóxico en *E. coli*

Para averiguar si alguno de los ORFs encontrados en pB1000 producía algún péptido que provocaba la inestabilidad del plásmido en *E. coli*, estudiamos la expresión de los dos ORFs de mayor tamaño, el ORF40 y el ORF3, de manera individual. Utilizar un vector de expresión nos permitió observar el efecto producido sobre la estabilidad del plásmido al reprimir e inducir la expresión de los ORFs, así como su expresión y visualización mediante *Western Blot*. Gracias a esto, comprobamos que únicamente la expresión del ORF40 afectaba a la estabilidad del vector pBAD43, ya que tanto el plásmido original como pBAD-3 se mantuvieron 100% estables en las poblaciones analizadas en condiciones de inducción de la expresión (Figura 34). No solo eso, sino que la expresión del ORF40 en el vector pBAD-40 provocó la drástica pérdida del plásmido, ya que tras 10 generaciones prácticamente no quedó ninguna bacteria portadora del vector. Además, el análisis por *Western Blot* de la cepa portadora del ORF40 nos permitió visualizar la producción de este péptido al inducir la expresión del ORF (Figura 35). Por lo tanto, con ambas técnicas pudimos confirmar que el ORF40 codificado en pB1000 daba lugar a la producción de un péptido de pequeño tamaño que provocaba la rápida pérdida del plásmido en este hospedador.

Si aunamos este resultado a la disminución del coste biológico observada en los plásmidos que portaban una secuencia de inserción, todo indica que este péptido produce un elevado coste biológico al ser expresado en *E. coli*. Las posibles causas de este *fitness cost* son variadas. Es conocido que la expresión de proteínas en contextos celulares diferentes a los que suelen encontrarse puede alterar la regulación de redes o procesos celulares, produciendo pequeñas alteraciones que en conjunto derivan en una reducción del *fitness* bacteriano (Baltrus, 2013). Su expresión en *E. coli* también podría producir efectos citotóxicos por un plegamiento incorrecto, que, en cantidades suficientes, puede derivar en una despolarización de la membrana y producción de OH^\cdot , generando un estrés celular que puede llegar a ser letal para la bacteria (Kohanski *et al.*, 2008; Drummond & Wilke, 2009).

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la importancia de ciertos tipos de péptidos de naturaleza hidrofóbica en la regulación a nivel de membrana de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Alix & Blanc-Potard, 2009). En muchos de estos casos, los péptidos descritos son toxinas que forman parte de sistemas TA en los que la antitoxina es un ARN pequeño (Gerdes *et al.*, 1986; Kawano *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2004; Fozo *et al.*, 2008). Estos péptidos hidrofóbicos pueden alterar la membrana celular a través de interacciones con proteínas de membrana, dañando su estructura y alterando su potencial (Figura 46), o inducir la expresión de genes relacionados con la respuesta al estrés que alteran el crecimiento bacteriano (Fozo *et al.*, 2008), pero en muchos casos la función fisiológica y la diana de la toxina son desconocidas (Kawano *et al.*, 2002; Fozo *et al.*, 2008).

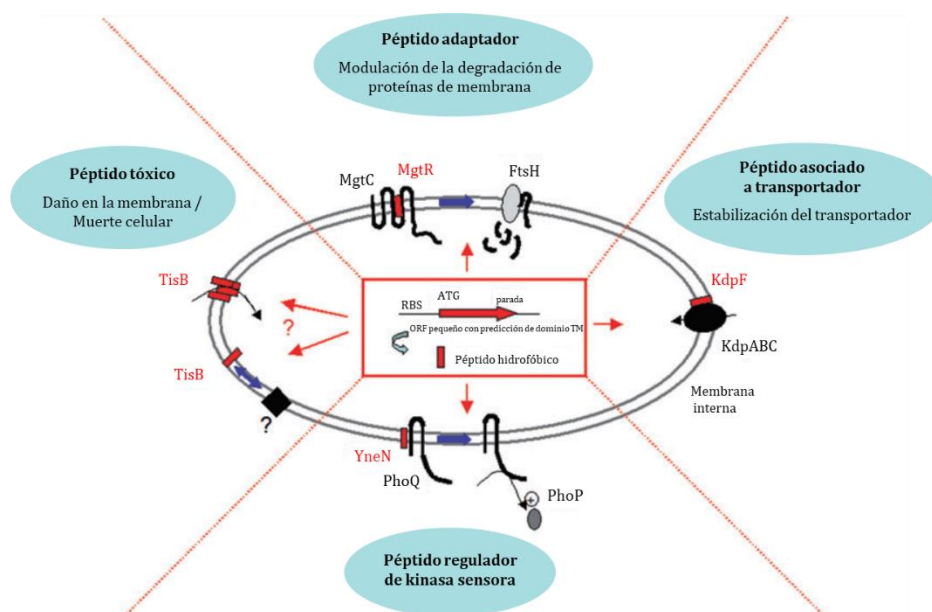


Figura 46. Papel de los péptidos hidrofóbicos a nivel de la membrana bacteriana. Los péptidos hidrofóbicos están codificados en ORFs pequeños y se localizan en la membrana interna (rectángulos rojos). Los péptidos tóxicos como TisB podrían formar poros y/o interactuar con proteínas de membrana para dañar la membrana y producir la muerte celular. Otros péptidos promueven la degradación o estabilización (MgtR y KdpF) o la activación (YneN) de proteínas de membrana conocidas. Modificado de (Alix & Blanc-Potard, 2009).

Aunque no encontramos péptidos homólogos al alinear el ORF40 con las bases de datos, la estructura proteica en forma de dos α -hélices, así como su composición altamente hidrofóbica (Figura 38), permiten plantear la posibilidad de que el péptido expresado a partir del ORF40 actúe sobre la membrana en *E. coli*, generando un efecto tóxico por

alteración de la membrana, que se traduce en una reducción del *fitness* bacteriano. Si este fuera el caso, dicho ORF40 podría formar parte de un nuevo sistema TA codificado en el plásmido pB1000. Sería interesante, por tanto, investigar la presencia de una antitoxina en esta región de pB1000, así como, en el caso de que exista, investigar las causas por las que su expresión en *E. coli* no es suficiente para neutralizar la toxicidad generada por el ORF40. De nuevo, el análisis transcriptómico del plásmido pB1000 nos permitirá conocer la presencia de transcritos en esta región del plásmido, y confirmar si el ORF40 forma parte de un sistema TA.

Estos resultados los complementamos con el análisis del comienzo de traducción del ORF40. Al analizar la secuencia del ORF40, comprobamos que su traducción comenzaba en el codón GTG, el segundo codón de inicio más frecuente en *E. coli*. La existencia del mismo codón tres aa corriente abajo de su secuencia hizo que planteáramos la posibilidad de que la valina en posición 4 fuera realmente el inicio de su traducción. Esto nos llevó a realizar las construcciones V1GTC y V4GTC, en las que, al mutar GTG a GTC, se minimizaba la traducción del ARNm a partir de ese codón (Figura 36). La estabilidad de estas dos construcciones fue, sin lugar a dudas, muy interesante, ya que esperábamos un resultado similar al del clonaje de los dos ORFs, en el que se observara claramente la pérdida de una de las construcciones y el mantenimiento estable de la otra, sin embargo, no fue así.

La construcción V1GTC fue mucho más estable que V4GTC, lo que sugirió que el ORF40 comenzaba en el primer codón GTC, teniendo una longitud total de 42 aa, ya que si el codón de inicio fuera la valina en posición 4, habríamos observado un incremento de estabilidad del mutante V4GTC. El aumento de estabilidad al mutar la valina 1, no obstante, no alcanzó los niveles de estabilidad del vector en condiciones de represión del ORF, y el porcentaje de bacterias portadoras del plásmido en la población comenzó a decaer a partir de la generación 20 (Figura 37). Esto podría deberse a que existe una pequeña parte de la

población bacteriana en la que el ORF40 se expresa incluso cuando el codón de inicio es GTC, tal y como describen Hecht y colaboradores (Hecht *et al.*, 2017). Esto provocaría una disminución del *fitness* en las bacterias que producen el péptido, generando poco a poco un aumento de la población libre de plásmido. Sin embargo, a partir de la generación 40 vimos que el porcentaje de bacterias con plásmido quedaba estabilizado en torno al 20%, y se mantuvo en estos niveles hasta la generación 80. Habría sido interesante analizar los plásmidos y cromosomas de estas poblaciones al finalizar la medición de estabilidad, puesto que es posible que, aunque la explicación más sencilla fuera que en dichas bacterias no existía expresión del ORF40, también podrían haberse desarrollado mecanismos adaptativos a lo largo de los ensayos de estabilidad que permitieran la compensación y adaptación de estos plásmidos, como mutaciones cromosómicas compensatorias o, al igual que observábamos en pB1000, mutaciones en los plásmidos que disminuyeran su coste biológico o aumentaran su número de copias estabilizándolos en la población.

2.3. El ORF40 altera el fenotipo de E. coli y provoca la aparición de mutantes espontáneos capaces de compensar su toxicidad

Al observar el fenotipo de las colonias que expresaban el ORF40, detectamos un cambio claro en el crecimiento de las mismas. Mientras que todas las cepas incubadas en condiciones de represión del ORF crecían con una morfología homogénea y con un tamaño de colonia similar a la cepa WT, al añadir arabinosa al medio la cepa portadora de pBAD-40 dio lugar a colonias más pequeñas, aunque igualmente homogéneas (Figura 39). Esta observación es coherente con los resultados previos, puesto que si el ORF40 induce un efecto tóxico que disminuye el *fitness* bacteriano, dichas bacterias se dividirán más lentamente, lo que dará lugar a un tamaño de colonias menor, y finalmente producirá la pérdida del plásmido en la población que no esté expuesta a una presión selectiva.

Al igual que vimos con las evoluciones compensatorias de pB1000, la bacteria Ec-pBAD40, que expresa el ORF40 en el vector pBAD43, también fue capaz de compensar el coste asociado a la expresión del péptido. En una evolución a corto plazo en presencia de antibiótico, observamos la recuperación del fenotipo WT de las colonias gracias a la inserción de la IS5 en el plásmido, en todos los casos produciendo la interrupción del ORF40 (Figuras 40 y 41). Es posible que, al tener pBAD43 un número de copias bajo, se vea favorecida esta estrategia evolutiva frente a la de mutar el *oriV* del replicón, como vimos que ocurría en el caso de pB1000.

Por otro lado, el fenotipo de las colonias del mutante Ec-V4 fue inesperado. La inducción del ORF40 en el plásmido V4GTC no generó un crecimiento como el de la cepa Ec-pBAD40, sino que dio lugar a colonias mucho más pequeñas, que no alcanzaron el mismo tamaño que las colonias WT ni las colonias de Ec-pBAD40, y a una pequeña proporción de colonias mutantes más grandes, que en algunos casos llegaron a ser de un tamaño superior al de las WT. Este efecto podría ser debido a que la mutación sinónima de la valina en posición 4 en este ORF40 induce una toxicidad mayor que el ORF40 original. Tradicionalmente se asumía que las mutaciones silenciosas no producían un efecto sobre la expresión proteica puesto que la secuencia aminoacídica no cambiaba, sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que este tipo de mutaciones pueden alterar tanto el nivel de traducción como la función y afinidad de las proteínas por, entre otras causas, alteración de la estructura y plegamiento del ARNm, o por cambios en la utilización de codones que alteren las reservas celulares (Kimchi-Sarfaty *et al.*, 2007).

En cualquier caso, el fenotipo del mutante V4GTC parecía indicar un aumento de la toxicidad del ORF. Además, el hecho de encontrar una alteración tan clara de la morfología de las colonias podría indicar que, al igual que ocurre con otros péptidos hidrofóbicos, la toxicidad del ORF40 se produzca a nivel de la membrana celular (Alix & Blanc-Potard, 2009). Este

pequeño péptido podría estar afectando de alguna forma a la síntesis de la membrana bacteriana o interactuando con componentes de membrana que desequilibren el balance de cargas, y que esto derive en una alteración del crecimiento de las colonias (Figura 46). Uno de los proyectos que realizaremos próximamente será la obtención y purificación del péptido para estudiar si es capaz de alterar la estructura de la membrana bacteriana, al igual que ocurre con otros péptidos hidrofóbicos (Unoson & Wagner, 2008).

Continuando con el fenotipo alterado de la cepa Ec-V4.2, aparte de las colonias de muy pequeño tamaño también observamos la aparición de colonias mutantes al inducir la expresión, las cuales conseguían compensar la toxicidad del ORF40 en muy pocas generaciones sin necesidad de un periodo de presión selectiva como ocurrió con la cepa Ec-pBAD40. Al analizar los plásmidos de varios de estos mutantes, vimos que las estrategias seguidas para conseguir compensar el efecto pernicioso del ORF40 sobre el crecimiento bacteriano fueron más variadas que con el plásmido pBAD-40, ya que encontramos plásmidos en los que se había insertado la IS5, plásmidos con mutaciones en el promotor desde el que se transcribía el ORF40, y un solo plásmido en el que no existía ningún tipo de mutación. Una de las incógnitas a la que de momento no hemos conseguido dar respuesta es la razón por la que la mutación en la valina 4 del ORF40 permite a la bacteria esta variedad de estrategias compensatorias, que no observamos con la expresión del ORF40 original.

2.4. *DnaK y su importancia en la compensación de la toxicidad del ORF40*

Tras secuenciar la cepa Ec-V4.2, que había recuperado el fenotipo WT sin ninguna mutación en el plásmido, vimos que la única mutación presente en todo el genoma en comparación con las otras dos cepas secuenciadas consistía en una delección de 19 pb en el gen *dnaK*, codificante de la proteína DnaK. Esta proteína, también conocida como chaperona Hsp70, forma parte, junto con DnaJ, GrpE y otras proteínas, del operón encargado de generar una

respuesta al estrés o shock térmico y a otros tipos de estrés ambiental (LaRossa & Van Dyk, 1991). Además, DnaK ejerce otras funciones celulares de manera constitutiva. Al igual que otras chaperonas, tiene un papel importante en ayudar al correcto plegamiento de las proteínas celulares de nueva síntesis, ensamblaje de estructuras proteicas, o translocación de proteínas secretadas a través de la membrana celular (Zhu *et al.*, 1996). Aparte de estas funciones, DnaK también se ha asociado con la replicación cromosómica y de elementos móviles como plásmidos y fagos (Friedman *et al.*, 1984; Ezaki *et al.*, 1989), y se han descrito su actividad ATPasa y capacidad de autofosforilación (Panagiotidis *et al.*, 1994).

La delección de 19 pb encontrada en el mutante afectó a la región C-terminal de la proteína, eliminando sus últimos 80 aa, que forman parte del dominio de unión al sustrato (SBD) de la proteína (Mayer & Bukau, 2005). Dicho dominio está formado por dos subdominios: un primer subdominio que comprende los residuos aminoacídicos 393 a 502 de la proteína, con una estructura en forma de ocho β -láminas entre las que se conforma un bolsillo hidrofóbico de unión al sustrato, y un segundo subdominio, de los residuos 509 al 607, formado por cinco estructuras de α -hélices, que facilitan la unión estable del sustrato a la proteína (Zhu *et al.*, 1996). Por tanto, es posible que la eliminación de esta porción de la región C-terminal de DnaK en el mutante Ec-V4.2 afecte a la capacidad de unión de DnaK a su sustrato.

Como hemos dicho, DnaK interacciona con multitud de péptidos y proteínas celulares, y se ha comprobado que interacciona preferentemente con péptidos de naturaleza hidrofóbica, como es el caso del ORF40 (Clerico *et al.*, 2015). Por ello, planteamos la hipótesis de que al menos parte del efecto tóxico observado al expresar el ORF40 se deba a su interacción con la proteína DnaK. En la literatura encontramos que el mutante C[74], al cual se delecionaron los últimos 74 aa de la proteína, mantuvo su actividad ATPasa, (Cegielska & Georgopoulos, 1989), y se ha comprobado que la unión del sustrato al dominio SBD de DnaK genera la activación de su actividad ATPasa (Clerico *et al.*, 2015). Por tanto, esto podría indicar que la

eliminación de esta región proteica no afecta a su capacidad de unión a otras proteínas, por lo que la hipótesis de que el ORF40 actúe uniéndose a DnaK parece poco probable, e induce a pensar que existe otro mecanismo por el que DnaK es capaz de compensar el efecto deletéreo del ORF40 y permitir la recuperación del crecimiento normal de *E. coli*.

Como hemos comentado previamente, la expresión de péptidos hidrofóbicos puede producir distintos efectos tóxicos a nivel de la membrana celular, y en algunos casos estos efectos son debidos a la inducción de una respuesta al estrés global, que desencadena una disminución del crecimiento bacteriano (Hengge, 2011). De hecho, Fozo y colaboradores comprobaron que la sobreexpresión de 4 péptidos hidrofóbicos codificados en el genoma de *E. coli* producía la despolarización de la membrana celular en tan solo 20 minutos, y tras analizar la expresión génica del genoma completo, comprobaron que la sobreexpresión de estas toxinas inducía a su vez una sobreexpresión de múltiples genes relacionados con respuesta al estrés, entre ellos los genes de respuesta al shock térmico *ibpB*, *ibpA*, y *htpG* (Fozo *et al.*, 2008).

La proteína DnaK forma parte de los genes inducidos en respuesta al shock térmico y otros tipos de estrés ambiental, por lo que el efecto tóxico del ORF40 podría inducir una sobreexpresión de esta proteína, dando como resultado una alteración del crecimiento bacteriano, como hemos observado al inducir la expresión de los plásmidos pBAD-40 y pBAD-V4 (Figura 39), y su sobreexpresión podría llegar a producir un efecto bactericida (Blum *et al.*, 1992), lo que explicaría la rápida pérdida de las bacterias portadoras de los plásmidos en la población. El análisis de los niveles de expresión de DnaK en condiciones de inducción y de represión del ORF40 permitirá investigar esta posibilidad.

Finalmente, y a modo de conclusión, la principal hipótesis sería que el ORF40 induce un elevado coste biológico al ser expresado en *E. coli*, probablemente por una alteración de la membrana celular (Figura 46). Dicha alteración podría deberse a su interacción con

proteínas de membrana o con otro tipo de diana molecular, que desencadena una respuesta de estrés general. Esto induce la sobreexpresión de la proteína DnaK, y posiblemente otras proteínas relacionadas con la respuesta al estrés, lo que se traduce en una alteración del crecimiento bacteriano.

La alteración producida por la expresión del ORF40 puede ser compensada mediante varios mecanismos: uno de ellos, impidiendo su expresión al interrumpir su secuencia mediante la adquisición de secuencias de inserción cromosómicas, como hemos visto tanto en el caso de pB1000 como en el caso de pBAD43. Otra estrategia que hemos observado, que puede ser complementaria a la anterior, sería mutando el gen *dnaK*. Como hemos visto en el mutante Ec-V4.2, la mutación en este gen, pese a no compensar totalmente la toxicidad producida por la expresión del ORF40 (ya que los plásmidos siguen siendo inestables en la población), permite la recuperación del fenotipo de colonia y de la velocidad de crecimiento de la cepa WT. Esto podría indicar que la mutación de DnaK impide la sobreexpresión de esta proteína inducida por la toxicidad del ORF40, y por tanto permite la recuperación del fenotipo WT, aunque tampoco podemos descartar que la toxicidad generada por el ORF40 se produzca por su interacción con el dominio SBD de DnaK. Como he comentado, intentaremos continuar con esta línea de investigación para averiguar a qué nivel celular actúa el ORF40 y produce su toxicidad en *E. coli*, y así poder esclarecer la relación entre la proteína DnaK y la recuperación del crecimiento bacteriano.



CONCLUSIONES / CONCLUSIONS

Las conclusiones de esta Tesis Doctoral son:

PRIMERA. La evolución compensatoria de pB1000 en *E. coli*, especie en la que no ha sido descrito en la naturaleza y en la que inicialmente es inestable, promueve la adaptación plásmido-hospedador, dando lugar a la estabilización de pB1000 en esta especie bacteriana.

FIRST. Compensatory evolution of pB1000 in *E. coli*, a species where pB1000 has never been described in nature and where it is initially unstable, promotes plasmid-host adaptation, leading to the stabilization of pB1000 in this bacterial species.

SEGUNDA. La estabilización de pB1000 en *E. coli* es debida a la adquisición de secuencias de inserción cromosómicas y a la aparición de polimorfismos de un único nucleótido en el origen de replicación plasmídico.

SECOND. The stabilization of pB1000 in *E. coli* is produced by the acquisition of chromosomal insertion sequences and by the appearance of single nucleotide polymorphisms in the origin of replication of the plasmid.

TERCERA. Los polimorfismos en el origen de replicación producen un aumento del número de copias plasmídico y un incremento del nivel de resistencia, mientras que las secuencias de inserción reducen el coste biológico de pB1000 al interrumpir el ORF40.

THIRD. The polymorphisms in the origin of replication induce an increase in the plasmid copy number and an augmentation of the resistance level, while the insertion sequences reduce the biological cost of pB1000 by the disruption of ORF40.

CUARTA. El ORF40 codifica un péptido de 42 aa que sólo se ha descrito en plásmidos pequeños de la familia *Pasteurellaceae*. Su expresión en el vector pBAD43, al igual que ocurría en pB1000, produce la rápida pérdida del plásmido en la población.

FOURTH. The ORF40 encodes a 42 aa-long peptide that has only been described in small plasmids from the *Pasteurellaceae* family. The expression of ORF40 in the vector pBAD43 induces, as it occurred with pB1000, the rapid loss of the plasmid in the population.

QUINTA. La expresión del ORF40 en *E. coli* altera su crecimiento, dando lugar a colonias de menor tamaño; la mutación sinónima de la valina en posición 4 del péptido afecta igualmente al crecimiento bacteriano, y provoca la aparición de colonias mutantes con recuperación del fenotipo *wildtype*.

FIFTH. The expression of ORF40 in *E. coli* alters its growth, generating colonies of a smaller size; the synonym mutation of the valine at position 4 of the peptide equally affects the bacterial growth, and produces mutant colonies that recover the wildtype phenotype.

SEXTA. La mutación de la proteína DnaK cromosómica que acorta la proteína en 80 aa es responsable de la recuperación del fenotipo *wildtype* en el mutante de *E. coli*, lo que sugiere la relación entre DnaK y la toxicidad generada por la expresión del ORF40.

SIXTH. The mutation in the DnaK chromosomal protein that shortens the protein by 80 aa is responsible for the recovery of the wildtype phenotype of the *E. coli* mutant, which suggests the relationship between DnaK and the toxicity generated by the expression of ORF40.



BIBLIOGRAFÍA

- Abraham, E. P. and Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin (Reprinted from *Nature*, vol. 146, p. 837, 1940). *Rev Infect Dis*, 10(4): 677-678.
- Aguilar-Rodriguez, J., Sabater-Munoz, B., Montagud-Martinez, R., Berlanga, V., Alvarez-Ponce, D., Wagner, A. and Fares, M. A. (2016). The molecular chaperone DnaK is a source of mutational robustness. *Genome Biol Evol*, 8(9): 2979-2991.
- Albornoz, E., Lucero, C., Romero, G., Quiroga, M. P., Rapoport, M., Guerriero, L., Andres, P., Rodriguez, C., Galas, M., Centron, D., Corso, A. and Petroni, A. (2017). Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical enterobacteria from Argentina. *Microb Drug Resist*, 23(2): 177-187.
- Alix, E. and Blanc-Potard, A. B. (2009). Hydrophobic peptides: novel regulators within bacterial membrane. *Mol Microbiol*, 72(1): 5-11.
- Alvarado, A., Garcillan-Barcia, M. P. and de la Cruz, F. (2012). A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS ONE*, 7(7): e40438.
- Ares-Arroyo, M., Bernabe-Balas, C., Santos-Lopez, A., Baquero, M. R., Prasad, K. N., Cid, D., Martin-Espada, C., San Millan, A. and Gonzalez-Zorn, B. (2018). PCR-based analysis of ColE1 plasmids in clinical isolates and metagenomic samples reveals their importance as gene capture platforms. *Front Microbiol*, 9: 469.
- Aslam, B., Wang, W., Arshad, M. I., Khurshid, M., Muzammil, S., Rasool, M. H., Nisar, M. A., Alvi, R. F., Aslam, M. A., Qamar, M. U., Salamat, M. K. F. and Baloch, Z. (2018). Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect Drug Resist*, 11: 1645-1658.
- Babakhani, S. and Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol*, 58(11): 905-917.
- Baharoglu, Z. and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6): 1126-1145.
- Baltrus, D. A. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol Evol*, 28(8): 489-495.
- Banos, R. C., Vivero, A., Aznar, S., Garcia, J., Pons, M., Madrid, C. and Juarez, A. (2009). Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. *PLoS Genet*, 5(6): e1000513.
- Barrick, J. E. and Lenski, R. E. (2009). Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 74: 119-129.
- Barrick, J. E. and Lenski, R. E. (2013). Genome dynamics during experimental evolution. *Nat Rev Genet*, 14(12): 827-839.
- Baxter, J. C. and Funnell, B. E. (2014). Plasmid partition mechanisms. *Microbiol Spect*, 2(6): PLAS-0023-2014.
- Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. and Levin, B. R. (2000). Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics*, 155(4): 1505-1519.
- Berry, T. M. and Christie, P. J. (2011). Caught in the act: the dialogue between bacteriophage R17 and the type IV secretion machine of plasmid R1. *Mol Microbiol*, 82(5): 1039-1043.
- Bert, A. G., Burrows, J., Osborne, C. S. and Cockerill, P. N. (2000). Generation of an improved luciferase reporter gene plasmid that employs a novel mechanism for high-copy replication. *Plasmid*, 44(2): 173-182.
- Bertani, G. (1999). Transduction-like gene transfer in the methanogen *Methanococcus voltae*. *J Bacteriol*, 181(10): 2992-3002.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O. and Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13(1): 42-51.
- Blanco, M., Kadlec, K., Gutierrez-Martin, C. B., de la Fuente, A. J., Schwarz, S. and Navas, J. (2007). Nucleotide sequence and transfer properties of two novel types of *Actinobacillus pleuropneumoniae* plasmids carrying the tetracycline resistance gene *tet(H)*. *J Antimicrob Chemother*, 60(4): 864-867.
- Blum, P., Ory, J., Bauernfeind, J. and Krska, J. (1992). Physiological consequences of DnaK and DnaJ overproduction in

- Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(22): 7436-7444.
- Bolger, A. M., Lohse, M. and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15): 2114-2120.
- Bonomo, J. and Gill, R. T. (2005). Amino acid content of recombinant proteins influences the metabolic burden response. *Biotechnol Bioeng*, 90(1): 116-126.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I. and Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J Antimicrob Chemother*, 72(12): 3317-3324.
- Bosse, J. T., Li, Y., Walker, S., Atherton, T., Fernandez-Crespo, R., Williamson, S. M., Rogers, J., Chaudhuri, R. R., Weinert, L. A., Oshota, O., Holden, M. T., Maskell, D. J., Tucker, A. W., Wren, B. W., Rycroft, A. N. and Langford, P. R. (2015). Identification of *dfrA14* in two distinct plasmids conferring trimethoprim resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 70(8): 2217-2222.
- Bouma, J. E. and Lenski, R. E. (1988). Evolution of a bacteria/plasmid association. *Nature*, 335(6188): 351-352.
- Branas, P., Villa, J., Viedma, E., Mingorance, J., Orellana, M. A. and Chaves, F. (2015). Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. *Int J Antimicrob Agents*, 46(1): 111-116.
- Brocchieri, L. and Karlin, S. (2005). Protein length in eukaryotic and prokaryotic proteomes. *Nucleic Acids Res*, 33(10): 3390-3400.
- Brocks, J. J., Jarrett, A. J. M., Sirantoine, E., Hallmann, C., Hoshino, Y. and Liyanage, T. (2017). The rise of algae in Cryogenian oceans and the emergence of animals. *Nature*, 548(7669): 578-581.
- Bush, K. and Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(8): a025247.
- Camps, M. (2010). Modulation of ColE1-like plasmid replication for recombinant gene expression. *Recent Pat DNA Gene Seq*, 4(1): 58-73.
- Cao, V., Lambert, T. and Courvalin, P. (2002). ColE1-like plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* encoding extended-spectrum β -lactamase CTX-M-17. *Antimicrob Agents Chemother*, 46(5): 1212-1217.
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*, 303(6-7): 298-304.
- Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K. L. and Threlfall, E. J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods*, 63(3): 219-228.
- Carr, I. M., Robinson, J. I., Dimitriou, R., Markham, A. F., Morgan, A. W. and Bonthron, D. T. (2009). Inferring relative proportions of DNA variants from sequencing electropherograms. *Bioinformatics*, 25(24): 3244-3250.
- Carroll, A. C. and Wong, A. (2018). Plasmid persistence: costs, benefits, and the plasmid paradox. *Can J Microbiol*, 64(5): 293-304.
- CDC. (2013). Antibiotic resistance threats in the United States. Department of Health and Human Services, Center for Disease Control and Prevention.
- Cegielska, A. and Georgopoulos, C. (1989). Functional domains of the *Escherichia coli* DnaK heat shock protein as revealed by mutational analysis. *J Biol Chem*, 264(35): 21122-21130.
- Cesareni, G., Helmer-Citterich, M. and Castagnoli, L. (1991). Control of ColE1 plasmid replication by antisense RNA. *Trends Genet*, 7(7): 230-235.
- Chant, E. L. and Summers, D. K. (2007). Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol Microbiol*, 63(1): 35-43.
- Chen, C. Y., Lindsey, R. L., Strobaugh, T. P. Jr., Frye, J. G. and Meinersmann, R. J. (2010). Prevalence of ColE1-like plasmids and kanamycin resistance genes in *Salmonella enterica* serovars. *Appl Environ Microbiol*, 76(20): 6707-6714.
- Chen, C. Y., Strobaugh, T. P. Jr., Nguyen, L. T., Abley, M., Lindsey, R. L. and Jackson, C. R. (2018a). Isolation and characterization of

- two novel groups of kanamycin-resistance ColE1-like plasmids in *Salmonella enterica* serotypes from food animals. *PLoS ONE*, 13(3): e0193435.
- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y. N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M. S. J., Fitzgerald, J. R. and Penades, J. R. (2018b). Genome hypermobility by lateral transduction. *Science*, 362(6411): 207-212.
- Chimerel, C., Field, C. M., Pinero-Fernandez, S., Keyser, U. F. and Summers, D. K. (2012). Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim Biophys Acta*, 1818(7): 1590-1594.
- Clerico, E. M., Tilitsky, J. M., Meng, W. and Gierasch, L. M. (2015). How Hsp70 molecular machines interact with their substrates to mediate diverse physiological functions. *J Mol Biol*, 427(7): 1575-1588.
- CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th edition. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohen, O., Gophna, U. and Pupko, T. (2011). The complexity hypothesis revisited: connectivity rather than function constitutes a barrier to horizontal gene transfer. *Mol Biol Evol*, 28(4): 1481-1489.
- Cook, M., Molto, E. and Anderson, C. (1989). Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *Am J Phys Anthropol*, 80(2): 137-143.
- Cooper, V. S. (2018). Experimental evolution as a high-throughput screen for genetic adaptations. *mSphere*, 3: e00121-18.
- Cottell, J. L., Webber, M. A. and Piddock, L. J. (2012). Persistence of transferable extended-spectrum- β -lactamase resistance in the absence of antibiotic pressure. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(9): 4703-4706.
- Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P. L. and Maas, W. K. (1988). Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev*, 52(3): 375-395.
- Dahlberg, C. and Chao, L. (2003). Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics*, 165(4): 1641-1649.
- Datta, N. and Hedges, R. W. (1972). Host ranges of R factors. *J Gen Microbiol*, 70(3): 453-460.
- Davies, J. and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3): 417-433.
- De Gelder, L., Ponciano, J. M., Joyce, P. and Top, E. M. (2007). Stability of a promiscuous plasmid in different hosts: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology*, 153(2): 452-463.
- De Gelder, L., Williams, J. J., Ponciano, J. M., Sota, M. and Top, E. M. (2008). Adaptive plasmid evolution results in host-range expansion of a broad-host-range plasmid. *Genetics*, 178(4): 2179-2190.
- de la Cruz, F. and Davies, J. (2000). Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microbiol*, 8(3): 128-133.
- de Toro, M., Rodriguez, I., Rojo-Bezares, B., Helmuth, R., Torres, C., Guerra, B. and Saenz, Y. (2013). pMdT1, a small ColE1-like plasmid mobilizing a new variant of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Antimicrob Chemother*, 68(6): 1277-1280.
- del Solar, G., Alonso, J. C., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R. (1996). Broad-host-range plasmid replication: an open question. *Mol Microbiol*, 21(4): 661-666.
- del Solar, G., Giraldo, R., Ruiz-Echevarria, M. J., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R. (1998). Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(2): 434-464.
- Derbyshire, K. M. and Grindley, N. D. (1986). Replicative and conservative transposition in bacteria. *Cell*, 47(3): 325-327.
- Dionisio, F., Conceicao, I. C., Marques, A. C., Fernandes, L. and Gordo, I. (2005). The evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol Lett*, 1(2): 250-252.
- Dixon, L. G., Albritton, W. L. and Willson, P. J. (1994). An analysis of the complete nucleotide sequence of the *Haemophilus ducreyi* broad-host-range plasmid pLS88. *Plasmid*, 32(2): 228-232.
- Drummond, D. A. and Wilke, C. O. (2009). The evolutionary consequences of erroneous protein synthesis. *Nat Rev Genet*, 10(10): 715-724.

- Durkacz, B. W. and Sherratt, D. J. (1973). Segregation kinetics of colicinogenic factor col E1 from a bacterial population temperature sensitive for DNA polymerase I. *Mol Gen Genet*, 121(1): 71-75.
- EMA. (2018). European Medicines Agency decision P/0103/2018 - Approval of plazomicin.
- Escudero, J. A., Loot, C., Nivina, A. and Mazel, D. (2015). The integron: adaptation on demand. *Microbiol Spectr*, 3(2): MDNA3-0019-2014.
- Ezaki, B., Ogura, T., Mori, H., Niki, H. and Hiraga, S. (1989). Involvement of DnaK protein in mini-F plasmid replication: temperature-sensitive seg mutations are located in the *dnaK* gene. *Mol Gen Genet*, 218(2): 183-189.
- Farrell, D. J., Morrissey, I., Bakker, S., Buckridge, S. and Felmingham, D. (2005). Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, 56(4): 773-776.
- Fernandez-Lopez, R., del Campo, I., Revilla, C., Cuevas, A. and de la Cruz, F. (2014). Negative feedback and transcriptional overshooting in a regulatory network for horizontal gene transfer. *PLoS Genet*, 10(2): e1004171.
- Field, C. M. and Summers, D. K. (2011). Multicopy plasmid stability: revisiting the dimer catastrophe. *J Theor Biol*, 291: 119-127.
- Field, C. M. and Summers, D. K. (2012). Indole inhibition of ColE1 replication contributes to stable plasmid maintenance. *Plasmid*, 67(2): 88-94.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*, 10(3): 226-236.
- Fozo, E. M., Kawano, M., Fontaine, F., Kaya, Y., Mendieta, K. S., Jones, K. L., Ocampo, A., Rudd, K. E. and Storz, G. (2008). Repression of small toxic protein synthesis by the *Sib* and *OhsC* small RNAs. *Mol Microbiol*, 70(5): 1076-1093.
- Francia, M. V., Varsaki, A., Garcillan-Barcia, M. P., Latorre, A., Drainas, C. and de la Cruz, F. (2004). A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiol Rev*, 28(1): 79-100.
- Friedman, D. I., Olson, E. R., Georgopoulos, C., Tilly, K., Herskowitz, I. and Banuett, F. (1984). Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage λ . *Microbiol Rev*, 48(4): 299-325.
- Frost, L. S., Leplae, R., Summers, A. O. and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol*, 3(9): 722-732.
- Galan, J. C., Morosini, M. I., Baquero, M. R., Reig, M. and Baquero, F. (2003). *Haemophilus influenzae* *bla*_{ROB-1} mutations in hypermutagenic Δ *ampC* *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and β -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8): 2551-2557.
- Galimand, M., Courvalin, P. and Lambert, T. (2003). Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(8): 2565-2571.
- Gama, J. A., Zilhao, R. and Dionisio, F. (2018). Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. *Plasmid*, 99: 82-88.
- Gangaiah, D., Marinov, G. K., Roberts, S. A., Robson, J. and Spinola, S. M. (2016). Draft whole-genome sequence of *Haemophilus ducreyi* Strain AUSPNG1, isolated from a cutaneous ulcer of a child from Papua New Guinea. *Genome Announc*, 4(1): e01661-15.
- Garcia-Aljaro, C., Balleste, E. and Muniesa, M. (2017). Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol*, 38: 95-105.
- Garcia, V., Vazquez, X., Bances, M., Herrera-Leon, L., Herrera-Leon, S. and Rodicio, M. R. (2019). Molecular characterization of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, genetic basis of antimicrobial drug resistance and plasmid diversity in ampicillin-resistant isolates. *Microb Drug Resist*, 25(2): 219-226.
- Garcillan-Barcia, M. P., Alvarado, A. and de la Cruz, F. (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5): 936-956.

- Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V. and de la Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol Rev*, 33(3): 657-687.
- Garcillan-Barcia, M. P., Ruiz del Castillo, B., Alvarado, A., de la Cruz, F. and Martinez-Martinez, L. (2015). Degenerate primer MOB typing of multiresistant clinical isolates of *E. coli* uncovers new plasmid backbones. *Plasmid*, 77: 17-27.
- GenBank. (2019). GenBank Database. National Center for Biotechnology Information (NCBI).
- Genilloud, O., Garrido, M. C. and Moreno, F. (1984). The transposon Tn5 carries a bleomycin-resistance determinant. *Gene*, 32(1-2): 225-233.
- Gerdes, K., Bech, F. W., Jorgensen, S. T., Lobner-Olesen, A., Rasmussen, P. B., Atlung, T., Boe, L., Karlstrom, O., Molin, S. and von Meyenburg, K. (1986). Mechanism of postsegregational killing by the *hok* gene product of the *parB* system of plasmid R1 and its homology with the *relF* gene product of the *E. coli relB* operon. *EMBO J*, 5(8): 2023-2029.
- Gerrish, P. J. and Lenski, R. E. (1998). The fate of competing beneficial mutations in an asexual population. *Genetica*, 102/103(1-6): 127-144.
- GLASS. (2019). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System. World Health Organization (WHO).
- Gonzales, M. F., Brooks, T., Pukatzki, S. U. and Provenzano, D. (2013). Rapid protocol for preparation of electrocompetent *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. *J Vis Exp*, 80: e50684.
- Gonzalez-Zorn, B., Teshager, T., Casas, M., Porrero, M. C., Moreno, M. A., Courvalin, P. and Dominguez, L. (2005). *armA* and aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*, 11(6): 954-956.
- Gould, K. (2016). Antibiotics: from prehistory to the present day. *J Antimicrob Chemother*, 71(3): 572-575.
- Grabherr, R. and Bayer, K. (2002). Impact of targeted vector design on ColE1 plasmid replication. *Trends Biotechnol*, 20(6): 257-260.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M. C. and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science*, 324(5930): 1034.
- Guzman, L. M., Belin, D., Carson, M. J. and Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} promoter. *J Bacteriol*, 177(14): 4121-4130.
- Hall, R. M. and Collis, C. M. (1995). Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol*, 15(4): 593-600.
- Handford, C. L., Stang, C. T., Raivio, T. L. and Dennis, J. J. (2009). The contribution of small cryptic plasmids to the antibiotic resistance of enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Can J Microbiol*, 55(11): 1229-1239.
- Harrison, E. and Brockhurst, M. A. (2012). Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. *Trends Microbiol*, 20(6): 262-267.
- Harrison, E., Guymier, D., Spiers, A. J., Paterson, S. and Brockhurst, M. A. (2015). Parallel compensatory evolution stabilizes plasmids across the parasitism-mutualism continuum. *Curr Biol*, 25(15): 2034-2039.
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301(5639): 1496-1499.
- Hecht, A., Glasgow, J., Jaschke, P. R., Bawazer, L. A., Munson, M. S., Cochran, J. R., Endy, D. and Salit, M. (2017). Measurements of translation initiation from all 64 codons in *E. coli*. *Nucleic Acids Res*, 45(7): 3615-3626.
- Hengge, R. (2011). The general stress response in Gram-negative bacteria. In *Bacterial Stress Responses*; Storz, G. and Hengge, R. (eds). ASM Press, Washington DC, USA, pp. 251-289.
- Hernandez-Arriaga, A. M., Chan, W. T., Espinosa, M. and Diaz-Orejas, R. (2014). Conditional activation of toxin-antitoxin systems: postsegregational killing and beyond. *Microbiol Spectr*, 2(5): PLAS-0009-2013.
- Hillen, W. and Berens, C. (1994). Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance. *Annu Rev Microbiol*, 48: 345-369.

- Hoefler, A. (2017). Regulation of the 16S rRNA aminoglycoside resistance methyltransferases: a functional and mutational analysis of the *armA* 5' UTR. Doctoral Thesis. *Universidad Complutense de Madrid*, Spain. ID Code 49994.
- Hughes, J. M., Lohman, B. K., Deckert, G. E., Nichols, E. P., Settles, M., Abdo, Z. and Top, E. M. (2012). The role of clonal interference in the evolutionary dynamics of plasmid-host adaptation. *MBio*, 3(4): e00077-00012.
- Ilangovan, A., Connery, S. and Waksman, G. (2015). Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends Microbiol*, 23(5): 301-310.
- Ingmer, H., Miller, C. and Cohen, S. N. (2001). The RepA protein of plasmid pSC101 controls *Escherichia coli* cell division through the SOS response. *Mol Microbiol*, 42(2): 519-526.
- Jain, A. and Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS Microbiol Lett*, 348(2): 87-96.
- Jensen, L. B., Garcia-Migura, L., Valenzuela, A. J., Lohr, M., Hasman, H. and Aarestrup, F. M. (2010). A classification system for plasmids from enterococci and other Gram-positive bacteria. *J Microbiol Methods*, 80(1): 25-43.
- Johnson, C. M. and Grossman, A. D. (2015). Integrative and conjugative elements (ICEs): what they do and how they work. *Annu Rev Genet*, 49: 577-601.
- Juteau, J. M. and Levesque, R. C. (1990). Sequence analysis and evolutionary perspectives of ROB-1 β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(7): 1354-1359.
- Karlowsky, J. A., Verma, G., Zhanel, G. G. and Hoban, D. J. (2000). Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*, 45(6): 871-875.
- Kawano, M., Oshima, T., Kasai, H. and Mori, H. (2002). Molecular characterization of long direct repeat (LDR) sequences expressing a stable mRNA encoding for a 35-amino-acid cell-killing peptide and a cis-encoded small antisense RNA in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 45(2): 333-349.
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. and Drummond, A. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.
- Keeling, P. J. and Palmer, J. D. (2008). Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet*, 9(8): 605-618.
- Kehrenberg, C., Hopkins, K. L., Threlfall, E. J. and Schwarz, S. (2007). Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J Antimicrob Chemother*, 60(4): 903-905.
- Kim, H. Y., Banerjee, S. K. and Iyer, V. N. (1994). The IncN plasmid replicon: two pathways of DNA polymerase I-independent replication. *J Bacteriol*, 176(24): 7735-7739.
- Kimchi-Sarfaty, C., Oh, J. M., Kim, I. W., Sauna, Z. E., Calcagno, A. M., Ambudkar, S. V. and Gottesman, M. M. (2007). A "silent" polymorphism in the *MDR1* gene changes substrate specificity. *Science*, 315(5811): 525-528.
- Kleckner, N. (1990). Regulating Tn10 and IS10 transposition. *Genetics*, 124(3): 449-454.
- Kleckner, N., Chalmers, R. M., Kwon, D., Sakai, J. and Bolland, S. (1996). Tn10 and IS10 transposition and chromosome rearrangements: mechanism and regulation *in vivo* and *in vitro*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 204: 49-82.
- Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., Wierzbowski, J., Cottarel, G. and Collins, J. J. (2008). Mistranslation of membrane proteins and two-component system activation trigger antibiotic-mediated cell death. *Cell*, 135(4): 679-690.
- Koraimann, G. and Wagner, M. A. (2014). Social behavior and decision making in bacterial conjugation. *Front Cell Infect Microbiol*, 4: 54.
- Krishnapillai, V. (1988). Molecular genetic analysis of bacterial plasmid promiscuity. *FEMS Microbiol Rev*, 4(3): 223-237.
- Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol*, 157(1): 105-132.

- Lamberte, L. E., Baniulyte, G., Singh, S. S., Stringer, A. M., Bonocora, R. P., Stracy, M., Kapanidis, A. N., Wade, J. T. and Grainger, D. C. (2017). Horizontally acquired AT-rich genes in *Escherichia coli* cause toxicity by sequestering RNA polymerase. *Nat Microbiol*, 2: 16249.
- Lancashire, J. F., Terry, T. D., Blackall, P. J. and Jennings, M. P. (2005). Plasmid-encoded Tet B tetracycline resistance in *Haemophilus parasuis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5): 1927-1931.
- Lang, A. S. and Beatty, J. T. (2000). Genetic analysis of a bacterial genetic exchange element: the gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(2): 859-864.
- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. and Beatty, J. T. (2012). Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol*, 10(7): 472-482.
- LaRossa, R. A. and Van Dyk, T. K. (1991). Physiological roles of the DnaK and GroE stress proteins: catalysts of protein folding or macromolecular sponges? *Mol Microbiol*, 5(3): 529-534.
- Lederberg, J. (1952). Cell genetics and hereditary symbiosis. *Physiol Rev*, 32(4): 403-430.
- Lee, H., Popodi, E., Tang, H. and Foster, P. L. (2012). Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109(41): E2774-2783.
- Lenski, R. E. (1991). Quantifying fitness and gene stability in microorganisms. *Biotechnology*, 15: 173-192.
- Lerminiaux, N. A. and Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol*, 65(1): 34-44.
- Lilly, J. and Camps, M. (2015). Mechanisms of theta plasmid replication. *Microbiol Spectr*, 3(1): PLAS-0029-2014.
- Lin-Chao, S., Chen, W. T. and Wong, T. T. (1992). High copy number of the pUC plasmid results from a Rom/Rop-suppressible point mutation in RNA II. *Mol Microbiol*, 6(22): 3385-3393.
- Loftie-Eaton, W., Yano, H., Burleigh, S., Simmons, R. S., Hughes, J. M., Rogers, L. M., Hunter, S. S., Settles, M. L., Forney, L. J., Ponciano, J. M. and Top, E. M. (2016). Evolutionary paths that expand plasmid host-range: implications for spread of antibiotic resistance. *Mol Biol Evol*, 33(4): 885-897.
- Lundquist, P. D. and Levin, B. R. (1986). Transitory derepression and the maintenance of conjugative plasmids. *Genetics*, 113(3): 483-497.
- MacLean, R. C. and San Millan, A. (2015). Microbial evolution: towards resolving the plasmid paradox. *Curr Biol*, 25(17): R764-R767.
- MacLean, R. C. and Vogwill, T. (2014). Limits to compensatory adaptation and the persistence of antibiotic resistance in pathogenic bacteria. *Evol Med Public Health*, 2015(1): 4-12.
- Maestro, B., Sanz, J. M., Diaz-Orejas, R. and Fernandez-Tresguerres, E. (2003). Modulation of pPS10 host range by plasmid-encoded RepA initiator protein. *J Bacteriol*, 185(4): 1367-1375.
- Maestro, B., Sanz, J. M., Faalen, M., Couturier, M., Diaz-Orejas, R. and Fernandez-Tresguerres, E. (2002). Modulation of pPS10 host range by DnaA. *Mol Microbiol*, 46(1): 223-234.
- Mahillon, J. and Chandler, M. (1998). Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(3): 725-774.
- Matsutani, S. (1991). Multiple copies of IS10 in the *Enterobacter cloacae* MD36 chromosome. *J Bacteriol*, 173(24): 7802-7809.
- Matter, D., Rossano, A., Sieber, S. and Perreten, V. (2008). Small multidrug resistance plasmids in *Actinobacillus porcitoncillarum*. *Plasmid*, 59(2): 144-152.
- Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 62(6): 670-684.
- Meyer, J., Iida, S. and Arber, W. (1980). Does the insertion element IS1 transpose preferentially into A+T-rich DNA segments? *Mol Gen Genet*, 178(2): 471-473.
- Meyer, R. (2009). Replication and conjugative mobilization of broad host-range IncQ plasmids. *Plasmid*, 62(2): 57-70.
- Million-Weaver, S. and Camps, M. (2014). Mechanisms of plasmid segregation: have

- multicopy plasmids been overlooked? *Plasmid*, 75: 27-36.
- Mitchell, M. A., Skowronek, K., Kauc, L. and Goodgal, S. H. (1991). Electroporation of *Haemophilus influenzae* is effective for transformation of plasmid but not chromosomal DNA. *Nucleic Acids Res*, 19(13): 3625-3628.
- Modi, R. I. and Adams, J. (1991). Coevolution in bacterial-plasmid populations. *Evolution*, 45(3): 656-667.
- Modi, R. I., Wilke, C. M., Rosenzweig, R. F. and Adams, J. (1991). Plasmid macroevolution: selection of deletions during adaptation in a nutrient-limited environment. *Genetica*, 84(3): 195-202.
- Mohr, K. I. (2016). History of antibiotics research. *Curr Top Microbiol Immunol*, 398: 237-272.
- Moleres, J., Santos-Lopez, A., Lazaro, I., Labairu, J., Prat, C., Ardanuy, C., Gonzalez-Zorn, B., Aragon, V. and Garmendia, J. (2015). Novel *bla*_{ROB-1}-bearing plasmid conferring resistance to β -lactams in *Haemophilus parasuis* isolates from healthy weaning pigs. *Appl Environ Microbiol*, 81(9): 3255-3267.
- Muesing, M., Tamm, J., Shepard, H. M. and Polisky, B. (1981). A single base-pair alteration is responsible for the DNA overproduction phenotype of a plasmid copy-number mutant. *Cell*, 24(1): 235-242.
- Munita, J. M. and Arias, C. A. (2016). Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2): VMBF-0016-2015.
- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C. A. and Hallet, B. (2015). The Tn3-family of replicative transposons. *Microbiol Spectr*, 3(4): MDNA3-0060-2014.
- Novick, R. P. (1987). Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev*, 51(4): 381-395.
- Nzabarushimana, E. and Tang, H. (2018). Insertion sequence elements-mediated structural variations in bacterial genomes. *Mob DNA*, 9: 29.
- Ochman, H., Lawrence, J. G. and Groisman, E. A. (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, 405(6784): 299-304.
- Oliveira, P. H., Touchon, M., Cury, J. and Rocha, E. P. C. (2017). The chromosomal organization of horizontal gene transfer in bacteria. *Nat Commun*, 8(1): 841.
- Olsen, R. H. and Shipley, P. (1973). Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor R1822. *J Bacteriol*, 113(2): 772-780.
- Orlek, A., Stoesser, N., Anjum, M. F., Doumith, M., Ellington, M. J., Peto, T., Crook, D., Woodford, N., Walker, A. S., Phan, H. and Sheppard, A. E. (2017). Plasmid classification in an era of whole-genome sequencing: application in studies of antibiotic resistance epidemiology. *Front Microbiol*, 8: 182.
- Pagotto, F. and Dillon, J. A. (2001). Multiple origins and replication proteins influence biological properties of β -lactamase-producing plasmids from *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol*, 183(19): 5472-5481.
- Pan, L., Leung, P. C. and Gu, J. D. (2010). A new ColE1-like plasmid group revealed by comparative analysis of the replication proficient fragments of *Vibrionaceae* plasmids. *J Microbiol Biotechnol*, 20(8): 1163-1178.
- Panagiotidis, C. A., Burkholder, W. F., Gaitanaris, G. A., Gragerov, A., Gottesman, M. E. and Silverstein, S. J. (1994). Inhibition of DnaK autophosphorylation by heat shock proteins and polypeptide substrates. *J Biol Chem*, 269(24): 16643-16647.
- Papagiannitsis, C. C., Dolejska, M., Izdebski, R., Dobiasova, H., Studentova, V., Esteves, F. J., Derde, L. P., Bonten, M. J., Hrabak, J. and Gniadkowski, M. (2015). Characterization of pKP-M1144, a novel ColE1-like plasmid encoding IMP-8, GES-5, and BEL-1 β -lactamases, from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 252 isolate. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8): 5065-5068.
- Papagiannitsis, C. C., Paskova, V., Chudejova, K., Medvecky, M., Bitar, I., Jakubu, V., Zemlickova, H., Jirsa, R. and Hrabak, J. (2018). Characterization of pEncl-30969cz, a novel ColE1-like plasmid encoding VIM-1 carbapenemase, from an *Enterobacter cloacae* sequence type 92 isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 91(2): 191-193.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N. and Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial

- resistance. *Clin Microbiol Rev*, 31(4): e00088-17.
- Petsko, G. and Ringe, D. (2004). From sequence to structure. In *Protein structure and function*; Lawrence, E. and Robertson, M. (eds). New Science Press, London, UK, pp. 2-47.
- Phillips, G. and Funnell, B. E. (2004). *Plasmid biology*. ASM Press, Washington, D.C., USA.
- Phillips, P. C. (2008). Epistasis – the essential role of gene interactions in the structure and evolution of genetic systems. *Nat Rev Genet*, 9(11): 855-867.
- Plotkin, J. B. and Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nat Rev Genet*, 12(1): 32-42.
- Pogliano, J., Ho, T. Q., Zhong, Z. and Helinski, D. R. (2001). Multicopy plasmids are clustered and localized in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(8): 4486-4491.
- Poirel, L., Kieffer, N. and Nordmann, P. (2017). *In vitro* study of IS*Apl1*-mediated mobilization of the colistin resistance gene *mcr-1*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(7): e00127-17.
- Porse, A., Schonning, K., Munck, C. and Sommer, M. O. (2016). Survival and evolution of a large multidrug resistance plasmid in new clinical bacterial hosts. *Mol Biol Evol*, 33(11): 2860-2873.
- Prestinaci, F., Pezzotti, P. and Pantosti, A. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathog Glob Health*, 109(7): 309-318.
- Providenti, M. A., O'Brien, J. M., Ewing, R. J., Paterson, E. S. and Smith, M. L. (2006). The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 65(3): 476-487.
- Putnoky, P., Kiss, G. B., Ott, I. and Kondorosi, A. (1983). Tn5 carries a streptomycin resistance determinant downstream from the kanamycin resistance gene. *Mol Gen Genet*, 191(2): 288-294.
- Rankin, D. J., Rocha, E. P. C. and Brown, S. P. (2011). What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity*, 106(1): 1-10.
- Reyes-Lamothe, R., Tran, T., Meas, D., Lee, L., Li, A. M., Sherratt, D. J. and Tolmasky, M. E. (2014). High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. *Nucleic Acids Res*, 42(2): 1042-1051.
- Ribeiro da Cunha, B., Fonseca, L. P. and Calado, C. R. C. (2019). Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go? *Antibiotics*, 8(2): 45.
- Roberts, A. P. and Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol*, 17(6): 251-258.
- Rodriguez-Beltran, J., Hernandez-Beltran, J. C. R., de la Fuente, J., Escudero, J. A., Fuentes-Hernandez, A., MacLean, R. C., Pena-Miller, R. and San Millan, A. (2018). Multicopy plasmids allow bacteria to escape from fitness trade-offs during evolutionary innovation. *Nat Ecol Evol*, 2(5): 873-881.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*, 14(3): 255-274.
- San Millan, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends Microbiol*, 26(12): 978-985.
- San Millan, A., Escudero, J. A., Catalan, A., Nieto, S., Farelo, F., Gibert, M., Moreno, M. A., Dominguez, L. and Gonzalez-Zorn, B. (2007). β -lactam resistance in *Haemophilus parasuis* is mediated by plasmid pB1000 bearing *bla_{ROB-1}*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6): 2260-2264.
- San Millan, A., Escudero, J. A., Gifford, D. R., Mazel, D. and MacLean, R. C. (2016). Multicopy plasmids potentiate the evolution of antibiotic resistance in bacteria. *Nat Ecol Evol*, 1(1): 0010.
- San Millan, A., Escudero, J. A., Gutierrez, B., Hidalgo, L., Garcia, N., Llagostera, M., Dominguez, L. and Gonzalez-Zorn, B. (2009). Multiresistance in *Pasteurella multocida* is mediated by coexistence of small plasmids. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(8): 3399-3404.
- San Millan, A., Garcia-Cobos, S., Escudero, J. A., Hidalgo, L., Gutierrez, B., Carrilero, L., Campos, J. and Gonzalez-Zorn, B. (2010). *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing *bla_{ROB-1}*: fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(4): 1506-1511.

- San Millan, A., Giufre, M., Escudero, J. A., Hidalgo, L., Gutierrez, B., Cerquetti, M. and Gonzalez-Zorn, B. (2011). Contribution of ROB-1 and PBP3 mutations to the resistance phenotype of a β -lactamase-positive amoxicillin/clavulanic acid-resistant *Haemophilus influenzae* carrying plasmid pB1000 in Italy. *J Antimicrob Chemother*, 66(1): 96-99.
- San Millan, A., Heilbron, K. and MacLean, R. C. (2014a). Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J*, 8(3): 601-612.
- San Millan, A. and MacLean, R. C. (2017). Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. *Microbiol Spectr*, 5(5): MTBP-0016-2017.
- San Millan, A., Pena-Miller, R., Toll-Riera, M., Halbert, Z. V., McLean, A. R., Cooper, B. S. and MacLean, R. C. (2014b). Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nat Commun*, 5: 5208.
- San Millan, A., Santos-Lopez, A., Ortega-Huedo, R., Bernabe-Balas, C., Kennedy, S. P. and Gonzalez-Zorn, B. (2015a). Small-plasmid-mediated antibiotic resistance is enhanced by increases in plasmid copy number and bacterial fitness. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(6): 3335-3341.
- San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q. and MacLean, R. C. (2015b). Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Commun*, 6: 6845.
- Santos-Lopez, A. (2016). Importancia de los plásmidos ColE1 en la resistencia a antibióticos. Doctoral Thesis. *Universidad Complutense de Madrid*, Spain. ID Code 44191.
- Santos-Lopez, A., Bernabe-Balas, C., Ares-Arroyo, M., Ortega-Huedo, R., Hoefler, A., San Millan, A. and Gonzalez-Zorn, B. (2017a). A naturally occurring single nucleotide polymorphism in a multicopy plasmid produces a reversible increase in antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(2): e01735-16.
- Santos-Lopez, A., Bernabe-Balas, C., San Millan, A., Ortega-Huedo, R., Hoefler, A., Ares-Arroyo, M. and Gonzalez-Zorn, B. (2017b). Compensatory evolution facilitates the acquisition of multiple plasmids in bacteria. *bioRxiv*: 187070.
- Sawyer, S. A., Dykhuizen, D. E., DuBose, R. F., Green, L., Mutangadura-Mhlanga, T., Wolczyk, D. F. and Hartl, D. L. (1987). Distribution and abundance of insertion sequences among natural isolates of *Escherichia coli*. *Genetics*, 115(1): 51-63.
- Shachrai, I., Zaslaver, A., Alon, U. and Dekel, E. (2010). Cost of unneeded proteins in *E. coli* is reduced after several generations in exponential growth. *Mol Cell*, 38(5): 758-767.
- Shaeer, K. M., Zmarlicka, M. T., Chahine, E. B., Piccicacco, N. and Cho, J. C. (2019). Plazomicin: a next-generation aminoglycoside. *Pharmacotherapy*, 39(1): 77-93.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. and Kamal, M. A. (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*, 22(1): 90-101.
- Shallcross, L. J. and Davies, S. C. (2014). The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*, 69(11): 2883-2885.
- Shapiro, E. D. and Ward, J. I. (1991). The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiol Rev*, 13: 113-142.
- Shen, M. M., Raleigh, E. A. and Kleckner, N. (1987). Physical analysis of Tn10- and IS10-promoted transpositions and rearrangements. *Genetics*, 116(3): 359-369.
- Shintani, M., Sanchez, Z. K. and Kimbara, K. (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol*, 6: 242.
- Silva, R. F., Mendonca, S. C., Carvalho, L. M., Reis, A. M., Gordo, I., Trindade, S. and Dionisio, F. (2011). Pervasive sign epistasis between conjugative plasmids and drug-resistance chromosomal mutations. *PLoS Genet*, 7(7): e1002181.
- Simmons, L. A., Foti, J. J., Cohen, S. E. and Walker, G. C. (2008). The SOS regulatory network. *EcoSal Plus*, 2008.
- Smillie, C., Garcillan-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. and de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(3): 434-452.

- Smith, H. O. and Marley, G. M. (1980). Purification and properties of HindII and HindIII endonucleases from *Haemophilus influenzae* Rd. *Methods Enzymol*, 65(1): 104-108.
- Solioz, M., Yen, H. C. and Marris, B. (1975). Release and uptake of gene transfer agent by *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*, 123(2): 651-657.
- Sota, M., Yano, H., Hughes, J. M., Daughdrill, G. W., Abdo, Z., Forney, L. J. and Top, E. M. (2010). Shifts in the host range of a promiscuous plasmid through parallel evolution of its replication initiation protein. *ISME J*, 4(12): 1568-1580.
- Soucy, S. M., Huang, J. and Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet*, 16(8): 472-482.
- Sousa, A., Bourgard, C., Wahl, L. M. and Gordo, I. (2013). Rates of transposition in *Escherichia coli*. *Biol Lett*, 9(6): 20130838.
- Stalder, T., Rogers, L. M., Renfrow, C., Yano, H., Smith, Z. and Top, E. M. (2017). Emerging patterns of plasmid-host coevolution that stabilize antibiotic resistance. *Sci Rep*, 7(1): 4853.
- Stoesser, N., Sheppard, A. E., Pankhurst, L., De Maio, N., Moore, C. E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L. W., Kasarskis, A., Batty, E. M., Kos, V., Wilson, D. J., Phetsouvanh, R., Wyllie, D., Sokurenko, E., Manges, A. R., Johnson, T. J., Price, L. B., Peto, T. E., Johnson, J. R., Didelot, X., Walker, A. S. and Crook, D. W. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *MBio*, 7(2): e02162.
- Stokes, H. W. and Gillings, M. R. (2011). Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 35(5): 790-819.
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H. and Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Front Microbiol*, 9: 2066.
- Summers, D. (1998). Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability. *Mol Microbiol*, 29(5): 1137-1145.
- Summers, D. K., Beton, C. W. and Withers, H. L. (1993). Multicopy plasmid instability: the dimer catastrophe hypothesis. *Mol Microbiol*, 8(6): 1031-1038.
- Summers, D. K. and Sherratt, D. J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: ColE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. *Cell*, 36(84): 1097-1103.
- Summers, D. K. and Sherratt, D. J. (1988). Resolution of ColE1 dimers requires a DNA sequence implicated in the three-dimensional organization of the *cer* site. *EMBO J*, 7(3): 851-858.
- Suzuki, H., Yano, H., Brown, C. J. and Top, E. M. (2010). Predicting plasmid promiscuity based on genomic signature. *J Bacteriol*, 192(22): 6045-6055.
- Tamarit, D., Neuvonen, M. M., Engel, P., Guy, L. and Andersson, S. G. E. (2018). Origin and evolution of the *Bartonella* gene transfer agent. *Mol Biol Evol*, 35(2): 451-464.
- Tatum, E. L. and Lederberg, J. (1947). Gene recombination in the bacterium *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 53(6): 673-684.
- Thomas, C. M. and Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 3(9): 711-721.
- Tomizawa, J. and Som, T. (1984). Control of ColE1 plasmid replication: enhancement of binding of RNA I to the primer transcript by the Rom protein. *Cell*, 38(3): 871-878.
- Tomizawa, J. I., Ohmori, H. and Bird, R. E. (1977). Origin of replication of colicin E1 plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 74(5): 1865-1869.
- Ton-Hoang, B., Turlan, C. and Chandler, M. (2004). Functional domains of the IS1 transposase: analysis *in vivo* and *in vitro*. *Mol Microbiol*, 53(5): 1529-1543.
- Tristram, S. G., Littlejohn, R. and Bradbury, R. S. (2010). *bla*_{ROB-1} presence on pB1000 in *Haemophilus influenzae* is widespread, and variable cefaclor resistance is associated with altered penicillin-binding proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(11): 4945-4947.
- Turner, P. E., Cooper, V. S. and Lenski, R. E. (1998). Tradeoff between horizontal and vertical modes of transmission in bacterial plasmids. *Evolution*, 52(2): 315-329.

- Turton, J. F., Ward, M. E., Woodford, N., Kaufmann, M. E., Pike, R., Livermore, D. M. and Pitt, T. L. (2006). The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Microbiol Lett*, 258(1): 72-77.
- Unoson, C. and Wagner, E. G. (2008). A small SOS-induced toxin is targeted against the inner membrane in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 70(1): 258-270.
- Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A. and Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Crit Rev Microbiol*, 43(6): 709-730.
- Ventola, C. L. (2015a). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, 40(4): 277-283.
- Ventola, C. L. (2015b). The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. *P T*, 40(5): 344-352.
- Vincent, A. T., Emond-Rheault, J. G., Barbeau, X., Attere, S. A., Frenette, M., Lague, P. and Charette, S. J. (2016). Antibiotic resistance due to an unusual ColE1-type replicon plasmid in *Aeromonas salmonicida*. *Microbiology*, 162(6): 942-953.
- Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E. G. and Altuvia, S. (2004). The small RNA IstR inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. *Curr Biol*, 14(24): 2271-2276.
- Wang, Y. (2017). Spatial distribution of high copy number plasmids in bacteria. *Plasmid*, 91: 2-8.
- Wang, Y., Penkul, P. and Milstein, J. N. (2016). Quantitative localization microscopy reveals a novel organization of a high-copy number plasmid. *Biophys J*, 111(3): 467-479.
- Wang, Z., Yuan, Z. and Hengge, U. R. (2004). Processing of plasmid DNA with ColE1-like replication origin. *Plasmid*, 51(3): 149-161.
- Wang, Z., Yuan, Z., Xiang, L., Shao, J. and Wegrzyn, G. (2006). tRNA-dependent cleavage of the ColE1 plasmid-encoded RNA I. *Microbiology*, 152(12): 3467-3476.
- Wegrzyn, G. and Wegrzyn, A. (2008). Is tRNA only a translation factor or also a regulator of other processes? *J Appl Genet*, 49(1): 115-122.
- WHO. (2017). Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. World Health Organization.
- WHO. (2019). World Antibiotic Awareness Week. World Health Organization.
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L. and Holt, K. E. (2017). Unicycler: resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*, 13(6): e1005595.
- Witkop, B. (1999). Paul Ehrlich and his magic bullets, revisited. *Proc Am Philos Soc*, 143(4): 540-557.
- Wong, A. (2017). Epistasis and the evolution of antimicrobial resistance. *Front Microbiol*, 8: 246.
- Wood, A. R., Lainson, F. A., Wright, F., Baird, G. D. and Donachie, W. (1995). A native plasmid of *Pasteurella haemolytica* serotype A1: DNA sequence analysis and investigation of its potential as a vector. *Res Vet Sci*, 58(2): 163-168.
- Wozniak, R. A. and Waldor, M. K. (2009). A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet*, 5(3): e1000439.
- Wozniak, R. A. and Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol*, 8(8): 552-563.
- Xu, Z., Chen, X., Li, L., Li, T., Wang, S., Chen, H. and Zhou, R. (2010). Comparative genomic characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *J Bacteriol*, 192(21): 5625-5636.
- Yamaguchi, Y., Park, J. H. and Inouye, M. (2011). Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annu Rev Genet*, 45: 61-79.
- Yang, J. and Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*, 43(W1): W174-W181.
- Yang, Q. E. and Walsh, T. R. (2017). Toxin-antitoxin systems and their role in disseminating and maintaining antimicrobial resistance. *FEMS Microbiol Rev*, 41(3): 343-353.
- Yao, S., Helinski, D. R. and Toukdarian, A. (2007). Localization of the naturally occurring plasmid ColE1 at the cell pole. *J Bacteriol*, 189(5): 1946-1953.

- Yavachev, L. and Ivanov, I. (1988). What does the homology between *E. coli* tRNAs and RNAs controlling ColE1 plasmid replication mean? *J Theor Biol*, 131(2): 235-241.
- Yelin, I. and Kishony, R. (2018). Antibiotic resistance. *Cell*, 172(5): 1136-1136.
- Zhang, C., Freddolino, P. L. and Zhang, Y. (2017). COFACTOR: improved protein function prediction by combining structure, sequence and protein-protein interaction information. *Nucleic Acids Res*, 45(W1): W291-W299.
- Zhu, X., Zhao, X., Burkholder, W. F., Gragerov, A., Ogata, C. M., Gottesman, M. E. and Hendrickson, W. A. (1996). Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. *Science*, 272(5268): 1606-1614.
- Zielenkiewicz, U. and Ceglowski, P. (2001). Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim Pol*, 48(4): 1003-1023.
- Zwanzig, M., Harrison, E., Brockhurst, M. A., Hall, J. P. J., Berendonk, T. U. and Berger, U. (2019). Mobile compensatory mutations promote plasmid survival. *mSystems*, 4(1): e00186-18.